

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow-Klinikum

DISSERTATION

Intestinale Galektinexpressionsmuster bei chronisch entzündlich Darmerkrankten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Carolin Schiffner
aus Bad Karlshafen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Andreas Sturm
 2. Prof. Dr. med. Axel Dignaß
 3. PD Dr. med. Jan Wehkamp

Datum der Promotion: 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Aufbau und Funktion der intestinalen Mukosa	6
1.2	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	9
1.3	Galektine	14
1.4	Galektin-1, -2 und -4	17
1.5	Zielsetzung	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Material	21
2.1.1	Antikörper	21
2.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmittel	22
2.1.3	Puffer und Lösungen	23
2.1.4	Geräte	25
2.2	Methoden	26
2.2.1	Immunhistochemie	26
2.2.1.1	Probengewinnung und Herstellung der Gefrierschnitte	26
2.2.1.2	Probengewinnung und Herstellung der Paraffinschnitte	26
2.2.1.3	Vorversuche	26
2.2.1.4	Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung	27
2.2.1.5	Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten	28
2.2.1.6	Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten	29
2.2.1.7	Kontrollen für die immunhistochemische Färbung	30
2.2.1.8	Photographische Dokumentation und Auswertung der Gewebeschnitte	30
2.2.2	Erhebung von klinischen Daten des Patientenkollektivs	33
2.2.2.1	Bestimmung des klinischen Aktivitätsindex bei den Patienten mit Morbus Crohn	33
2.2.2.2	Bestimmung des klinischen Aktivitätsindex bei den Patienten mit Colitis ulcerosa	35
2.2.3	Western Blot	37
2.2.3.1	Proteinextraktion	37
2.2.3.2	Proteinbestimmung	38
2.2.3.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38

Inhaltsverzeichnis

2.2.3.4	Western Blot.....	39
2.2.3.5	Detektion mit Antikörpern und Entwicklung	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Vergleich der intestinalen Galektin-Expression von Patienten mit CED zur Kontrollgruppe.....	42
3.1.1	Auswertung der Lamina epithelialis	43
3.1.2	Auswertung der Galektin-exprimierenden Immunzellen in der Lamina propria	46
3.2	Untersuchung zur intestinalen Galektin-Expression in Assoziation mit dem klinischen Aktivitätsindex	47
3.2.1	Auswertung der Lamina epithelialis	48
3.2.2	Auswertung der Galektin-exprimierenden Immunzellen in der Lamina propria	51
3.3	Untersuchung zur intestinalen Galektin-Expression in Assoziation mit dem endoskopischen Entzündungsgrad der Mukosa	52
3.3.1	Auswertung der Lamina epithelialis	53
3.3.2	Auswertung der Galektin-exprimierenden Immunzellen in der Lamina propria	56
3.4	Untersuchung zur Modulation der intestinalen Galektin-Expression durch TNF- α -Antikörper	57
3.4.1	Auswertung der Lamina epithelialis	58
3.4.2	Auswertung der Galektin-exprimierenden Immunzellen in der Lamina propria	59
3.5	Analyse der intestinalen Galektin-Expression mittels Western Blot.....	61
4	DISKUSSION	63
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	70
6	LITERATURVERZEICHNIS	72
7	DANKSAGUNG	79
8	LEBENS LAUF	80
9	ERKLÄRUNG	81

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
AEC	3-Amino-9-ethyl-carbazole
BSA	Bovines Serum Albumin
Caco-2	Humane Kolon-Adenocarcinoma Zelllinie
CAI	clinical activity index, klinischer Aktivitätsindex
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
CRD	carbohydrate-recognition domain (= Kohlenhydrat-Erkennungsregion)
CU	Colitis ulcerosa
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMF	N,N-Dimethylformamide
GIT	Gastrointestinaltrakt
HT-29	Humane Kolonkarzinom Zelllinie
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	kiloDalton
P	Patient
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: „phosphate buffered saline“)
RT	Raumtemperatur
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
T _{reg} Zellen	regulatorische T-Zellen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

1 EINLEITUNG

1.1 Aufbau und Funktion der intestinalen Mukosa

Der Darm stellt mit 200 m² die größte Oberfläche dar, mit der der menschliche Organismus mit der Außenwelt in Kontakt steht [1]. Dabei bildet die intestinale Mukosa die Innenschicht des Darms. Anatomisch ist sie aus drei Zellschichten aufgebaut: Epithelschicht, Lamina propria und Muscularis mucosae (Abb. 1). Die lumenseitige erste Schicht ist das einschichtige, hochprismatische Epithel. Es besteht aus Saumzellen (Colonozyten) mit kurzen Mikrovilli [2]. Die mukosale Epithelzellschicht bildet eine primäre, hochselektive Barriere gegen ein breites Spektrum von Noxen und antigen wirkenden Substanzen, die sich innerhalb des gastrointestinalen Lumens befinden [3]. Gleichzeitig muss die Resorption von Nahrungsbestandteilen, Elektrolyten und Wasser gewährleistet sein [2]. Um eine Diffusionsbarriere aufbauen zu können, befinden sich sogenannte Haftkomplexe mit Tight junctions zwischen den Epithelzellen. In die Zellmembran sind zudem Transportkanäle, energiekonvertierende Proteine (ATPasen) und spezifische Rezeptoren integriert. Dadurch wird eine kontrollierte Resorption und Sekretion gewährleistet. In die Epithelschicht eingelagert befinden sich Becherzellen, die die Muzine des bis zu 700 µm dicken Schleimteppichs produzieren [2]. Ferner sind in dieser Schicht enteroendokrine Zellen sowie Paneth- und M-Zellen zu finden. Das Epithel bildet Krypten, wodurch eine Vergrößerung der Oberfläche für Resorption und Sekretion geschaffen wird. Im Kryptengrund sitzen Stammzellen, die für die Erneuerung des Epithels verantwortlich sind. Das Mukosaepithel ist in der Lage, innerhalb von 24 bis 96 Stunden einen nahezu kompletten Austausch der intestinalen Epithelzellpopulation zu gewährleisten [4]. Eine schnelle Wiederherstellung der Integrität des Oberflächenepithels nach Verletzungen stellt somit eine besondere Fähigkeit des Epithels dar [4]. Unterhalb des Epithels befindet sich die Lamina propria, zellreiches Bindegewebe mit retikulären Fasern. Sie beherbergt terminale Verzweigungen von Blutgefäßen und Nerven sowie Lymphkapillaren und zahlreiche freie Zellen der Abwehr (Antigen-präsentierende Zellen, wie Makrophagen und dendritische Zellen, B- und T-Zellen) [3]. Die dritte Schicht ist die Muscularis mucosae. Sie ist eine Besonderheit der intestinalen Mukosa und kommt in keinem anderen Hohlorgan vor. Sie besteht aus glatten Muskelzellen und verleiht der Mukosa eine eigene Motilität [2].

Einleitung

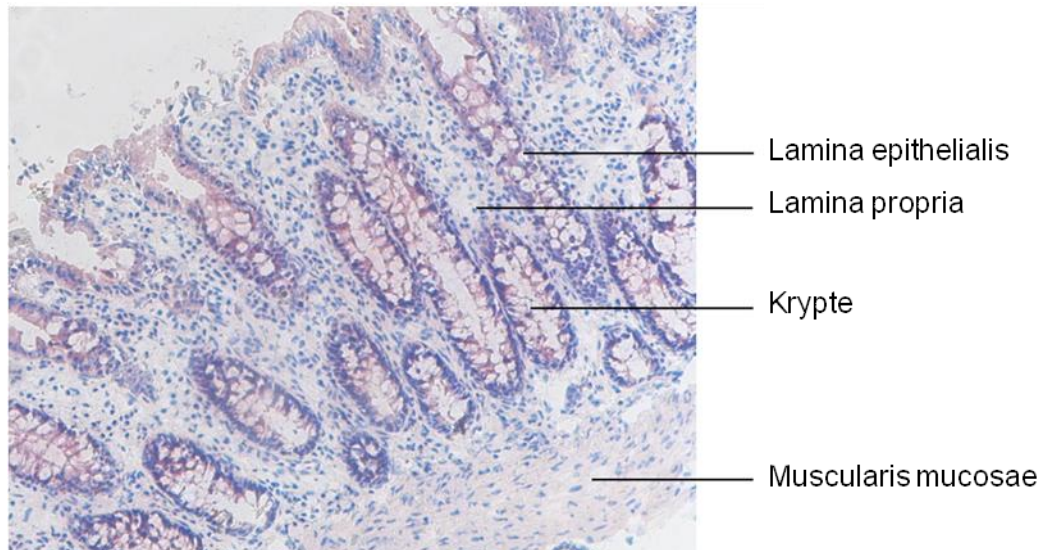


Abb. 1: Darstellung der intestinalen Mukosa. Die Mukosa ist anatomisch aus drei Schichten aufgebaut: Epithelzellschicht, Lamina propria und Muscularis mucosae (100fache Vergrößerung).

Die Tatsache, dass die Mukosa mit einer Gesamtoberfläche von 200 m^2 in direktem Kontakt mit der Außenwelt und zahlreichen Pathogenen steht, stellt besondere Aufgaben für das intestinale Immunsystem dar. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die Unterscheidung zwischen pathogenen und apathogenen Antigenen durch das Immunsystem [3]. An der Stelle der höchsten Antigen- und Pathogendichte, nämlich dem Darmlumen, muss das Immunsystem den Körper vor der Invasion von Pathogenen durch eine kontrollierte Immunabwehr bewahren [3]. Dabei muss u.a. das Eindringen von toxischen Stoffen, wie z.B. von der intestinalen Mikroflora produzierte Endotoxine, verhindert werden. Gleichzeitig müssen apathogene Nahrungsmittelantigene sowie die kommensale Flora des Darms durch das Immunsystem als ungefährlich erkannt werden und die Aufnahme von Nährstoffen über das Epithel gewährleistet sein [5]. Das intestinale Immunsystem besitzt daher die besondere Fähigkeit der sogenannten oralen Toleranz, d.h. die physiologische Toleranz gegenüber Antigenen der Nahrung und Darmflora [6]. Die Unterscheidung zwischen pathogenen und apathogenen Antigenen stellt die Voraussetzung für die intestinale Homöostase und die Symbiose zwischen der intestinalen Darmflora und dem menschlichen Körper dar. Kommt es durch den Verlust der physiologischen Toleranz gegenüber Bestandteilen der kommensalen Darmflora zu einer überschießenden Immunantwort, kann es zu chronischen Entzündungen kommen [7].

Einleitung

Dem Umfang dieser vielfältigen Aufgaben begegnet das intestinale Immunsystem durch die größte Ansammlung von Immunzellen im Körper und einem hohen Maß an Differenzierung [8]. Hierfür hat es mehrere spezialisierte Kompartimente und einzigartige immunregulatorische Charakteristika. Kompartimente des intestinalen Immunsystems beinhalten die organisierten lymphatischen Gewebe in den Peyer'schen Plaques, mesenterialen Lymphknoten und die direkt unter dem Epithel gelegenen lymphatischen Follikel [3]. Dabei wird das intestinale Immunsystem generell in die antigen-unspezifische, angeborene und die antigen-spezifische, erworbene Immunantwort eingeteilt. Das angeborene Immunsystem umfasst Abwehrmechanismen, die zunächst unabhängig vom jeweils eindringenden Erreger aktiv werden. Es werden keine pathogenspezifischen Merkmale erkannt. Hierzu zählen neben der intestinalen Epithelschicht als physikalische Begrenzung auch chemische Mediatoren, wie die Defensine. Defensine sind antimikrobielle Peptide, die von Epithelzellen und Panethzellen sezerniert werden [9]. Sie können Poren in der Membran der bakteriellen Pathogene bilden und Entzündungsreaktionen verstärken [10]. Ferner gehören weitere chemische Mediatoren zur angeborenen Immunabwehr: Komplementfaktoren, Akute-Phase-Proteine und Lysozyme [11]. Daneben gibt es eine zellvermittelte unspezifische Immunabwehr bestehend aus Granulozyten und Makrophagen, die die Pathogene phagozytieren und somit unschädlich machen [11]. Im Gegensatz zum unspezifischen Immunsystem ist die erworbene Immunantwort in der Lage hochspezifisch auf ein jeweiliges Antigen zu reagieren und verfügt über ein immunologisches Gedächtnis. Dabei stellen B- und T-Lymphozyten sowie professionelle antigenpräsentierende Zellen, wie dendritische Zellen oder Makrophagen, den zellulären Bestandteil dar [11]. Der wesentliche Ort der spezifischen intestinalen Immunantwort ist die Lamina propria [5]. In diesem Kompartiment phagozytieren antigenpräsentierende Zellen Pathogene und das obsonierte Peptid wird den T-Zellen präsentiert. Durch die antigen-vermittelte Stimulierung der T-Zellen kommt es zur Aktivierung, Differenzierung und Expansion spezifischer T-Zellpopulationen, die Pathogene gezielt eliminieren [3].

Einleitung

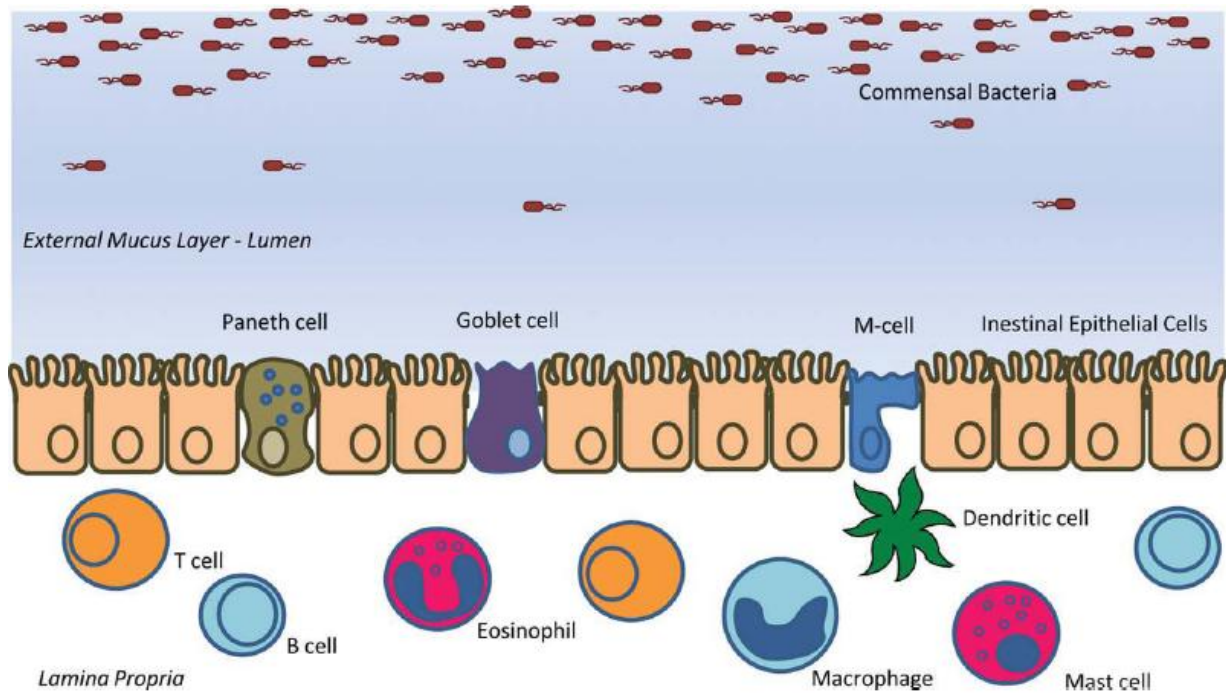


Abb. 2: Die verschiedenen Komponenten der mukosalen Barriere. Dies umfasst zunächst den Schleimteppich mit der relativ sterilen inneren Schicht, während in der äußeren Schicht kommensale Bakterien eine schützende Barriere bilden. Epithelzellen stellen die wesentlichen Träger der intestinalen Barriere dar. Neben ihrer rein mechanischen Schutzfunktion übernehmen sie eine Reihe von aktiven defensiven Aufgaben. In der Lamina propria bilden B- und T-Lymphozyten, Eosinophile, Mastzellen, dendritische Zellen und Makrophagen das zelluläre angeborene und erworbene Immunsystem (Quelle: Salim *et al.*, Inflammatory Bowel Disease 2010 [12]).

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Unter chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) versteht man zwei verschiedene Formen der intestinalen Entzündung, den Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa. Merkmale dieser Erkrankungen sind chronisch-rezidivierende entzündliche Veränderungen der Dick- und Dünndarmschleimhaut, die die Patienten in ihrem Leben nachhaltig beeinflussen.

Die Inzidenz beider Erkrankungen ist ähnlich und liegt in Deutschland bei 5 - 10/100000 pro Jahr [13]. Während die Inzidenz der Colitis ulcerosa über die letzten Dekaden relativ konstant war, hat sich die Inzidenz des Morbus Crohn seit 1960 in Westeuropa und den USA versechsfacht und steigt weiter an [13]. Frauen und Männer sind ungefähr gleich häufig betroffen. Beide Krankheitsbilder werden in Nordamerika sowie Nord- und Mitteleuropa häufiger beobachtet als in südlicher gelegenen Ländern [14]. Es besteht

Einleitung

ein deutliches Nord-Süd-Gefälle mit besonderer Häufung in den skandinavischen Ländern [14].

CED kann in jedem Lebensalter auftreten, mit einem ersten Manifestationsgipfel zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr sowie einem zweiten, niedrigeren Gipfel zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr [13].

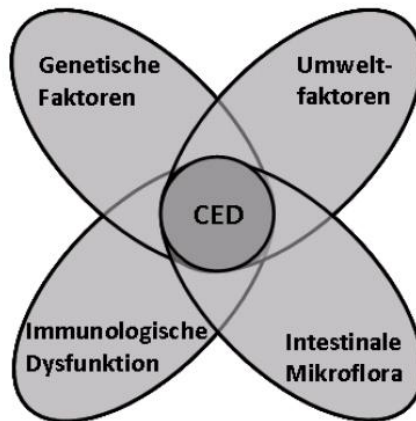


Abb. 3: Zusammenspiel verschiedener Faktoren in der Pathogenese der CED. Das Schema zeigt die vier grundlegenden Faktoren der Pathogenese: Umweltfaktoren, genetische Faktoren, eine immunologische Dysfunktion und die intestinale Mikroflora (Quelle: Kucharzik *et al.*, Inflammatory Bowel Disease 2006 [15])

Trotz intensiver Forschung sind die Pathogenese und Ätiologie der CED noch immer ungeklärt, gesichert ist jedoch eine multifaktorielle Entstehung. Das Zusammenspiel verschiedener Faktoren, wie Umweltfaktoren, genetische Prädisposition, immunologisch-regulatorischer Defekt und der individuellen Bakterienflora des Darms, spielt eine entscheidende Rolle [15].

Hinweise für die Bedeutung von Umweltfaktoren wurde durch die Zunahme der Inzidenz der CED mit zunehmender Industrialisierung und Entwicklung gewonnen [16]. Als mögliche Faktoren werden unter anderem Nikotin, Ernährung, Hygienestandard, Klima, Umweltverschmutzung und Stress diskutiert [17].

Familienuntersuchungen beschreiben die gehäufte Prävalenz von CED innerhalb von Familien und deuten zusammen mit Zwillingsuntersuchungen darauf hin, dass eine genetische Prädisposition besteht [18]. Interessanterweise ist dabei auch die Inzidenz von Morbus Crohn in Familien, in denen die Colitis ulcerosa vorkommt, erhöht und umgekehrt. Ferner konnten verschiedene Genmutationen auf unterschiedlichen

Einleitung

Chromosomen identifiziert und eine Assoziation zu CED nachgewiesen werden. Ogura *et al.* und Hugot *et al.* konnten 2001 den Zusammenhang zwischen der Mutation des NOD2/CARD15-Gens und der Anfälligkeit für Morbus Crohn nachweisen [19, 20].

Als Bindeglied zwischen genetischer Disposition und Umwelteinflüssen kann ein Defekt im Prozess der Immunregulation angesehen werden. Mukosal lokalisierte Lamina propria T-Zellen spielen bei dieser pathologischen Immunreaktion eine entscheidende Rolle [21]. Bei CED kommt es während der Initiierung und des Krankheitsverlaufs zu einem Ungleichgewicht zwischen Aktivierung, Proliferation und Apoptose von T-Zellen in der Lamina propria und dadurch zu einer unkontrollierten Migration und Anreicherung aktivierter T-Zellen in die intestinale Mukosa [21, 22]. Diese sind resistent gegenüber pro-apoptotischen Signalen und rekrutieren durch Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen aktivierte Neutrophile, dendritische Zellen, Makrophagen und natürliche Killerzellen, die die ausgelöste Immunantwort verstärken [21]. Es kommt zur Zerstörung der Epithelzellschicht und somit ihrer Barrierefunktion, was zu einer erhöhten Permeabilität des gastrointestinalen Epithels und somit zu einer Dauerstimulation des Immunsystems führt [14]. Die Folge ist eine chronische Entzündung der Mukosa, wie es bei CED der Fall ist [12].

Ein entscheidender Faktor bei dieser überschießenden Immunantwort stellt dabei die intestinale Mikroflora dar. Diese besteht zum Großteil aus apathogenen Keimen, sogenannten kommensalen Bakterien. Eine Hypothese in der Pathogenese der CED repräsentiert die Idee, dass sich das Immunsystem gegen diese kommensalen Bakterien richtet aufgrund einer Störung der oralen Toleranz [14]. Der Einfluss der mukosalen Mikroflora auf die Entstehung einer Colitis wurde in IL-2^{-/-}-Mausmodellen untersucht [23]. Die IL-2^{-/-}-Mäuse entwickelten unter mit Bakterien kontaminierten Bedingungen, aber nicht unter sterilen eine Colitis, was den Einfluß der Mikroflora auf die Pathogenese unterstreicht [23].

Trotz des ähnlichen Endpunktes in der Pathogenese, nämlich der überschießenden Immunantwort und der daraus resultierenden Entzündung, sind die makroskopischen und histologischen Entzündungsmuster zwischen den beiden Formen der CED verschieden. Beim Morbus Crohn findet man vor allem die Entzündung im terminalen Ileum und Kolon, obwohl sie an jeder Stelle des Verdauungstraktes vom Mund bis zum Anus vorkommen kann [13]. Dabei handelt es sich zunächst um Aphten, die sich zu flachen Schleimhautulzerationen entwickeln. Die Mukosa zwischen den Ulcera kann

Einleitung

deutlich ins Lumen ragen und so den typischen Aspekt des Pflastersteinreliefs hervorrufen (Abb. 4). Später betreffen die Veränderungen alle Wandschichten und können dann als tiefe intra- und transmurale Fissuren und Fisteln imponieren. Die Darmabschnitte sind dabei nur segmental betroffen, d. h. gesunde und betroffene Schleimhaut kommen nebeneinander vor (die Läsionen „überspringen“ gesunde Anteile: sog. Skip Lesions). Es kommt im Verlauf des chronischen Entzündungsprozesses zu ödematösen und fibrotischen Verdickungen der Darmwand mit Ausbildung segmentaler Stenosen. Histologisch ist der Morbus Crohn neben unspezifischen entzündlichen Veränderungen durch Epitheloidzellgranulome und mehrkernige Riesenzellen gekennzeichnet, die in 40 % der Fälle nachgewiesen werden können [13].

Bei der Colitis ulcerosa beginnt die Erkrankung meist distal im Rektum und breitet sich kontinuierlich nach proximal im Kolon aus. Die initialen Schleimhautveränderungen sind durch ein Schleimhautödem sowie eine erhöhte Verletzlichkeit der Schleimhaut (Kontaktblutung) gekennzeichnet (Abb. 4). Die Entzündungsreaktion ist dabei auf die Mukosa beschränkt und zeichnet sich histologisch durch Ulzerationen aus. Besonders die Krypten sind in Form von Kryptenabszessen befallen. Abheilende Mukosa kann sich vollständig regenerieren, häufiger resultiert jedoch eine Schleimhautatrophie oder isoliert wachsendes Granulationsgewebe (Pseudopolypen) [13].

Einleitung

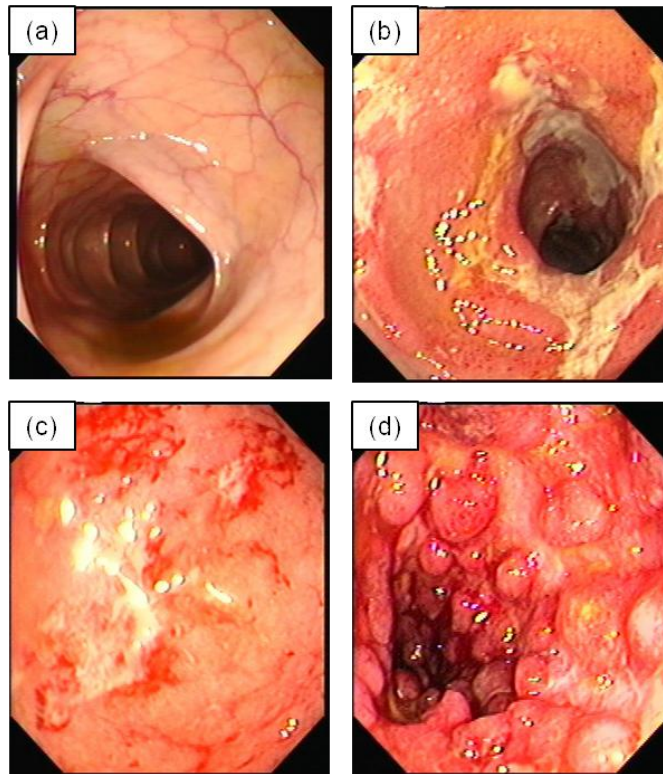


Abb. 4: Endoskopische Aufnahmen im Rahmen von Koloskopien. (a) Der Normalbefund des Kolons zeichnet sich durch eine glatte, spiegelnde Oberfläche mit einer homogen zartrosa Farbe aus. Das Netzwerk der Gefäße ist sichtbar. (b) Ausgeprägter Morbus Crohn mit Ulcera und Pflastersteinrelief (c) Colitis ulcerosa mit kontinuierlich, blutigen Schleimhautschäden (d) Chronisch aktive Colitis ulcerosa mit Ulcerationen, ödematös verdickter Schleimhaut und Pseudopolypen (Quelle: Medizinische Klinik m. S. Hepatologie und Gastroenterologie, Charité, CVK).

Aufgrund der Tatsache, dass beide Erkrankungen durch die chronisch entzündlichen Veränderungen der Dick- und Dünndarmschleimhaut charakterisiert sind, sind die Eindämmung der mukosalen Entzündungsreaktion sowie eine Wiederherstellung der intestinalen Barriere für die Therapie der CED essentiell. Aufgrund der vielfältigen Ursachen und der nicht vollständig verstandenen Pathogenese der CED basieren die meisten Therapien auf einer unspezifischen Hemmung der mukosalen Entzündungsreaktion. Diese Therapien umfassen in der Regel Kortikosteroide, Aminosalizylate oder Immunsuppressiva, z.B. Azathioprin [24]. Fortschritte im Verständnis zur Pathogenese der CED haben jedoch eine zielgerichtetere Therapie möglich gemacht, um selektiver in den Entzündungsprozess eingreifen zu können. Die Applikation von Antikörpern gegen TNF- α hat eine Reduktion der mukosalen Entzündung erzielt und sich somit günstig auf beide CED-Formen, Morbus Crohn und

Colitis ulcerosa, ausgewirkt [25, 26]. TNF- α ist ein multifunktionaler Signalstoff (Zytokin) des Immunsystems, welcher an lokalen und systemischen Entzündungen beteiligt ist [27]. Dieses von Monozyten, Makrophagen und T-Zellen produzierte Zytokin spielt in der Entzündungskaskade im Darm eine zentrale Rolle [27]. Es entfaltet seine biologische Aktivität durch die Bindung an bestimmte Membranrezeptoren und induziert über diese intrazelluläre Signaltransduktionswege. Dabei kommt es über die Aktivierung von B- und T-Zellen sowie neutrophilen Granulozyten zu einer Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und einer Zerstörung der epithelialen Barriere [28]. TNF- α -Antikörper binden mit hoher Spezifität und Affinität zirkulierende und membrangebundene TNF- α -Moleküle und neutralisieren dadurch die biologischen Effekte von TNF- α [28]. Ferner deuten einige Daten darauf hin, dass TNF- α -Antikörper auch durch die Induktion der Apoptose von Immunzellen (T-Zellen und Makrophagen) anti-inflammatorisch wirken [29]. Dennoch limitieren ausgeprägte Nebenwirkungen, wie Überempfindlichkeitsreaktionen, Infektionen, GIT-Beschwerden, und die hohen Kosten den Einsatz der Antikörper gegen TNF- α . Ferner sprechen nicht alle Patienten auf diese Therapie an, was die Relevanz der Erforschung von effizienteren Therapien unterstreicht. Ziel in der Behandlung der CED ist es, die Immunhomöostase und natürlich vorkommende anti-entzündliche Systeme wiederherzustellen. Dabei bieten die zurzeit zur Verfügung stehenden therapeutischen Optionen keine zufriedenstellende Therapie, da die aktuellen Medikamente entweder unspezifisch das Immunsystem hemmen oder nur einen von vielen pro-inflammatorischen Wegen blockieren. Folglich gibt es einen großen Bedarf für alternative und effizientere Behandlungsmöglichkeiten der CED.

1.3 Galektine

Galektine sind kohlenhydratbindende Proteine (Glykoproteine), die der Gruppe der Lektine zugeordnet und durch ihre hohe Affinität zu β -Galaktosiden charakterisiert werden können [30]. Sie besitzen eine hochkonservierte Kohlenhydrat-Erkennungsregion (carbohydrate-recognition domain = CRD) bestehend aus 130 Aminosäuren [30]. Diese Region ist für eine spezifische Erkennung von zuckerhaltigen Strukturen auf der Zelloberfläche verantwortlich. Basierend auf der Anzahl der CRD und der biochemischen Struktur werden die Galektine in drei Untergruppen eingeteilt: Galektine vom Proto-Typ, vom Chimären-Typ und vom Tandem-Repeat-Typ [31]. Proto-

Einleitung

Typ Galektine besitzen eine CRD, mit der die Galektine nicht-kovalent dimerisieren oder als Monomere bleiben können. Zu dieser Gruppe gehören Galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 und -15 [32]. Galektine vom Chimären-Typ bestehen aus einer C-terminalen CRD, die mit einer prolin- und glycinreichen N-terminalen Region verbunden ist. Galektin-3 ist das bisher einzige bekannte Galektin dieser Untergruppe. Der Tandem-Repeat-Typ ist charakterisiert durch zwei unterschiedliche, aber homologe CRDs (Galektin-4, -6, -8, -9 und -12). Insgesamt sind 15 verschiedene Galektine in Säugern bekannt [32].

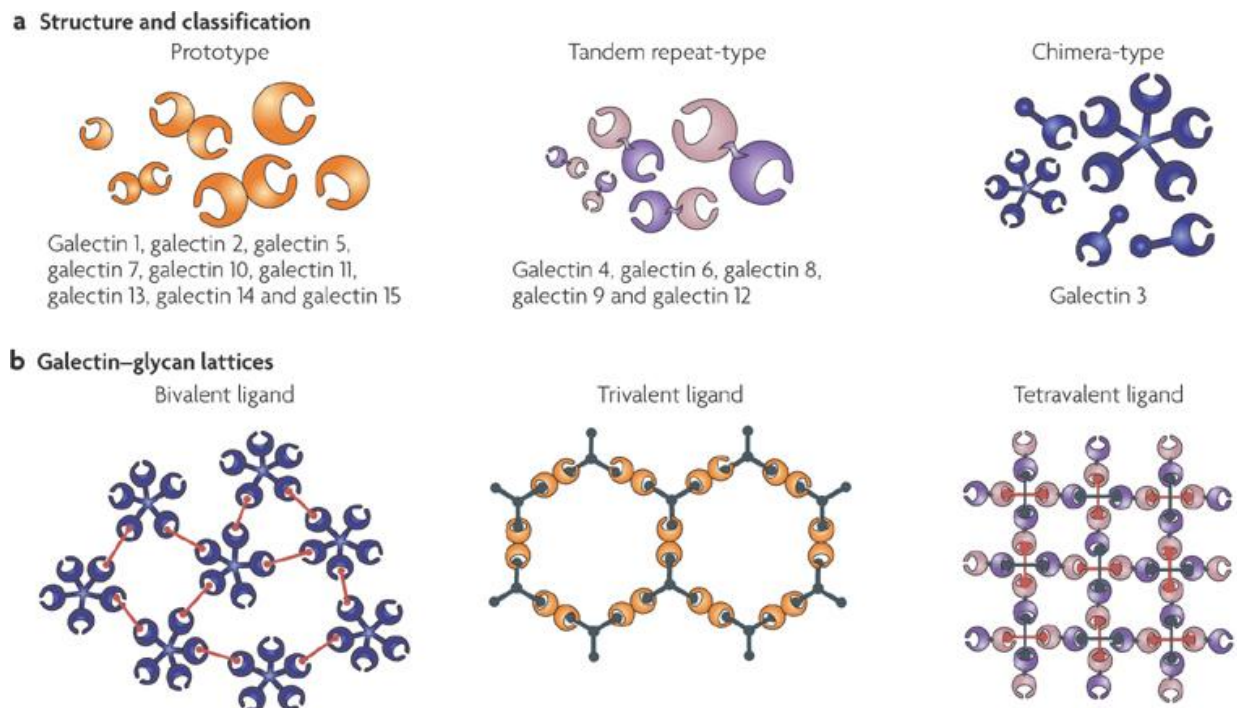


Abb. 5: Struktur und Quervernetzung der Galektine. (a) Schematische Darstellung der Struktur der Galektinfamilie. Galektine können in drei Klassen eingeteilt werden: Proto-Typ Galektine, die eine CRD besitzen und entweder als Monomer bleiben oder Homodimere bilden können; Tandem-Repeat-Typ Galektine, die zwei CRDs besitzen und über eine aus 70 Aminosäuren bestehenden Kette miteinander verbunden sind; Chimäre-Typ Galektin 3, das aus einer C-terminalen CRD besteht, die mit einer prolin- und glycinreichen N-terminalen Region verbunden ist. (b) Schematische Darstellung von verschiedenen Gitternetzwerken, die zwischen multivalenten Galektinen und Kohlenhydraten gebildet werden können (Quelle: Rabinovich *et al.*, Nature 2009 [33]).

Galektine kommen sowohl intrazellulär vor und können aber auch in den Extrazellularraum sezerniert werden [30]. Die Sekretion erfolgt jedoch über einen bis

Einleitung

jetzt noch unbekanntem Weg, der eine intakte Bindung an Kohlenhydrate durch das sezernierte Protein erfordert. Sie besitzen dabei keine klassische Signalsequenz [34]. Sobald sie außerhalb der Zelle sind, sind Galektine in der Lage über traditionelle Liganden-Rezeptor-Interaktionen an Rezeptoren verschiedener Zellen zu binden und Signaltransduktionswege zu induzieren und zu beeinflussen. Dabei können sie verschiedene Zelltypen über die Bindung ihrer Rezeptoren miteinander vernetzen, wodurch ihnen ein breites Spektrum an Signaltransduktionswegen offen steht [35]. Ferner sind sie in der Lage auf der Zelloberfläche geordnete Netzwerke mit Kohlenhydraten zu binden (Gitter). Im Gegensatz zu Zytokinen haben Galektine keine spezifischen individuellen Rezeptoren [32]. Stattdessen kann ein Galektin an eine große Anzahl von Glykoproteinen und Glykolipiden auf der Zelloberfläche binden [32]. Sie binden dabei primär an die Galactoseeinheit von N-Acetyllactosamin [33].

Zu den extrazellulären Funktionen der Galektine gehört die Regulation der T-Zell-Homöostase. Galektine sind an Signalwegen der Zellaktivierung, Zellwachstum- und Apoptose, sowie der Zytokinsekretion beteiligt [32]. Untersuchungen an T-Zellen aus dem peripheren Blut und aus der Lamina propria der intestinalen Mukosa zeigen, dass Galektin-2 an den CD29-Rezeptor und Galektin-4 an den CD3-Rezeptor auf der T-Zelloberfläche bindet [36, 37]. Die Interaktion beider Galektine mit T-Zellen initiiert eine gesteigerte Apoptose stimulierter T-Zellen [36, 37].

Daneben können auch einige Galektine im intrazellulären Kompartiment der Zellen Signalwege induzieren. Zu den intrazellulären Funktionen der Galektine gehören ebenfalls die Regulation von Zellwachstum und -apoptose, aber auch andere grundlegende Signalwege wie die Regulation des Zellzyklus und des prä-mRNA-Spleißens [32]. Der intrazelluläre Mechanismus basiert dabei mehr auf Protein-Protein-Interaktionen als auf Kohlenhydratbindung [32]. Bisher wurde vor allem für Galektin-3 gezeigt, dass es an eine Reihe von intrazellulären Proteinen bindet und dadurch Transduktionswege beeinflusst [38]. Die intrazellulären Funktionen von anderen Galektinen, wie Galektin-1, -9 und -10, sind aktuell im Fokus der Forschung.

Während einige Galektine in vielen Geweben zu finden sind, wie z.B. das Galektin-1, werden andere Galektine mehr selektiv exprimiert. Beispielsweise werden Galektin-2 und -4 hauptsächlich von Epithelzellen im Gastrointestinaltrakt (GIT) exprimiert [39, 40]. Innerhalb des Immunsystems exprimieren aktivierte Makrophagen, aktivierte B-Zellen, Dendritische Zellen, sowie aktivierte und regulatorische T-Zellen Galektine [35]. Die

Expression der Galektine unterliegt einem Regulationsmechanismus während der Aktivierung und Differenzierung der Immunzellen. Dabei wird sie ferner moduliert durch verschiedene Zytokine und Chemokine. Obwohl verschiedene regulatorische Elemente in der Promotorregion der Galektingene identifiziert werden konnten, ist der molekulare Mechanismus der Regulation der Galektinexpression noch nicht geklärt [32].

1.4 Galektin-1, -2 und -4

Galektin-1, ein Galektin vom Proto-Typ, wurde vor mehr als 20 Jahren als ein β -Galaktose-bindendes Lektin von 14,5 kDa mit typischer hämagglutinierender Aktivität entdeckt [41]. Seitdem konnten Studien Galektin-1 in vielen Geweben und Zellen identifizieren. Dennoch rückte dieses endogene Galektin erst in den letzten Jahren als ein Regulator der angeborenen und erworbenen Immunantwort in den Fokus der Forschung [35]. In diesem Zusammenhang wurde das Galektin-1 vor allem als anti-inflammatorisches Agens detektiert. In *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass aktivierte T-Zellen, die mit rekombinanten Galektin-1 behandelt wurden, eine reduzierte Sekretion der von Th1-Zellen freigesetzten Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-12 und IFN- γ) und eine erhöhte Sekretion von Th2 Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13) aufwiesen [42]. In diesem Kontext zeigen verschiedene Studien eine Induktion von IL-10 in ruhenden und aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen unter der *in vitro* Behandlung mit rekombinanten Galektin-1 [42]. Ferner interagiert Galektin-1 in die Leukozytenmigration, in dem es die T-Zell-Adhäsion an extrazelluläre Matrix sowie die transendotheliale Migration der T-Zellen während einer Entzündung inhibiert [43, 44]. Neben den *in vitro* Untersuchungen belegen verschiedene Mausmodelle das anti-inflammatorische Potential von Galektin-1. In Modellen für chronische Entzündung und Autoimmunität konnte unter der Gabe von rekombinanten Galektin-1 eine Reduktion der klinischen und histopathologischen Merkmale einer Entzündung detektiert werden [45]. In einem Colitis-Modell konnte gezeigt werden, dass die Galektin-1-Expression unter intestinaler Entzündung herunterreguliert war [46]. Unter der Gabe von menschlichem, rekombinanten Galektin-1 konnte eine induzierte Apoptose der Effektor-T-Zellen verzeichnet werden [46]. Diese Datenlage belegt das therapeutische Potential von Galektin-1 bezüglich einer Reduktion der intestinalen Entzündung.

Einleitung

In Hinsicht auf den GIT haben Galektin-2 und Galektin-4 eine bedeutende Funktion. Es wurde gezeigt, dass beide Galektine vom gastrointestinalen Gewebe exprimiert werden, jedoch nicht vom Gewebe des Gehirns, der Niere, der gestreiften Muskulatur, der Leber und der Lunge [47]. Im Gegensatz zum breiten Expressionsmuster von Galektin-1 werden Galektin-2 und -4 hauptsächlich im GIT exprimiert.

Galektin-2 gehört wie Galektin-1 zur Gruppe der Prototyp-Galektine. In *in vitro* Untersuchungen konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Galektin-2 von intestinalen Epithelzellen exprimiert und sezerniert wird, an T-Zellen bindet und die Apoptose von aktivierten, aber nicht ruhenden mukosalen T-Lymphozyten induziert [36]. Unsere Arbeitsgruppe hat weiterhin den therapeutischen Effekt von Galektin-2 in einem DSS-induziertem Colitis-Mausmodell bewiesen [48]. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Galektin-2 im Colitis-Modell reduziert war und unter immunsuppressiver Behandlung angehoben werden konnte. Die Gabe von menschlichem, rekombinanten Galektin-2 induzierte die Apoptose mukosaler T-Zellen und verbesserte die akute und chronische DSS-induzierte Colitis [48]. Ferner hat unsere Arbeitsgruppe gezeigt, dass Galektin-2 die Zytokinsekretion aktivierter T-Zellen in Richtung eines T-Helfer-2-Profiles verschiebt und die Sekretion des pro-inflammatorischen TNF- α senkt. Dabei ist entscheidend, dass eine Reduktion von TNF- α einen positiven therapeutischen Effekt auf CED hat [49]. Aus diesem Grund weist Galektin-2 Möglichkeiten in der Therapie der CED als anti-inflammatorisches Agens auf. Durch Induktion der Apoptose von T-Zellen und Reduktion der TNF- α -Sekretion kann Galektin-2 natürlich vorkommende anti-inflammatorische Systeme wiederherstellen.

Der therapeutische Effekt von Galektin-2 konnte auch in einem Mausmodell für Kontaktallergie demonstriert werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Galektin-2 in der murinen Haut exprimiert und unter Entzündung herunterreguliert wird. Unter der Behandlung der Mäuse mit Galektin-2 wurde die Immunantwort auf das Allergen durch die Apoptose von aktivierten CD8+ T-Zellen reduziert [50].

Galektin-4 wird wie Galektin-2 im gastrointestinalen Trakt exprimiert. Studien haben den Einfluss von Galektin-4 auf T-Zellen *in vitro* und in einem murinen Colitis-Modell untersucht [37]. Dabei wurde gezeigt, dass Galektin-4 an den CD3-Rezeptor aktivierter, aber nicht ruhender T-Zellen bindet und die Apoptose dieser Zellen *in vivo* und *in vitro* induziert. Im Colitis-Modell zeigte sich eine reduzierte Entzündung bei Galektin-4-behandelten Mäusen [37]. Dadurch wird die Hypothese unterstützt, dass Galektin-4 eine entscheidende Rolle in der mukosalen Entzündung von CED spielt und das

Einleitung

Potential als ein anti-inflammatorisches Agens besitzt. Interessanterweise zeigte eine Studie von Hokama *et al.* 2003, dass Galektin-4 die IL-6-Sekretion von CD4+ T-Zellen, die aus TCR- α -knockout Mäusen isoliert wurden, induziert und somit die Exazerbation der intestinalen Entzündung fördert [51]. Man könnte die Ergebnisse der Arbeit von Hokama *et al.* damit erklären, dass Galektin-4 in diesen Versuchen einen anderen Rezeptor als den TCR als Bindungsstelle nutzte und dadurch auch andere Signaltransduktionswege induzierte.

Neben der Eindämmung der abnormalen T-Zell-vermittelten Immunreaktion spielt zudem die Wiederherstellung der intestinalen Barriereintegrität eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von CED. Dabei konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Galektin-2 und Galektin-4 *in vitro* die Epithelrestitution durch Initiierung der Migration und Zellzyklusaktivierung fördern können und damit eine wichtige Funktion bei Wundheilungsprozessen einnehmen [52]. Die immunmodulierende Wirkung und der positive Effekt auf die Epithelrestitution durch diese Galektine eröffnen eine neue therapeutische Option in der Behandlung von CED.

1.5 Zielsetzung

Der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa sind Erkrankungen, die durch die chronisch-rezidivierenden entzündlichen Veränderungen der Dün- und Dickdarmschleimhaut charakterisiert sind. Die Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankungen sind noch weitgehend ungeklärt, wobei verschiedene Faktoren diskutiert werden. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Dysregulation des intestinalen Immunsystems. Während der Initiierung und dem Verlauf der CED kommt es zu einer Aktivierung und Proliferation von T-Zellen in der Lamina propria sowie zu einer Resistenz dieser Zellen gegenüber pro-apoptotischen Signalen [22]. Diese Mechanismen führen zu einer unkontrollierten Anreicherung von aktivierten T-Zellen in der Mukosa und somit zu einer Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses [21].

Galektine sind an der Regulation der Immun- und Entzündungsantwort sowie der Immunhomöostase beteiligt [32]. Galektin-1, -2 und -4 spielen eine entscheidende Rolle in der Modulation der intestinalen Entzündung. *In vivo* wurde bereits das therapeutische Potential von Galektin -1, -2 und -4 auf die akute und chronische intestinale Entzündung in einem Colitis-Mausmodell belegt [37, 46, 48]. Dabei konnte eine Induktion der Apoptose aktivierter T-Zellen und eine Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokine

Einleitung

durch diese Galektine festgestellt werden. Galektine sind in der Lage anti-inflammatorische Systeme wieder herzustellen und stellen somit eine mögliche therapeutische Option bei der Behandlung der CED da.

Untersuchungen in Hinblick auf die intestinale Galektin-Expression bei Patienten mit CED stehen jedoch bisher noch aus.

Ziel dieser Doktorarbeit ist die Untersuchung der Expression von Galektin-1, -2 und -4 im Dickdarm von Patienten mit CED. Dabei soll die Expression von Patienten mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen werden. Ferner soll die Expression in Assoziation mit dem klinischen Entzündungsindex und dem endoskopischen Entzündungsgrad analysiert werden.

Ergänzend wird untersucht, ob und in wie fern die therapeutische Blockade des zentralen pro-inflammatorischen Botenstoffes TNF- α die Galektin-Expression beeinflusst.

Aufgrund der Tatsache, dass Galektin-1 und -2 als Prototyp Galektine und Galektin-4, ein Tandem-Repeat-Galektin, strukturell verschiedenen Gruppen angehören, ist es im Rahmen dieser Promotionsarbeit von Bedeutung, Ähnlichkeiten und Unterschiede in Hinblick auf die intestinale Expression dieser Galektine zu detektieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Tabelle 1: Primärantikörper für die Gefrierschnitte

<i>Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-Galektin-1	Ziege	1/300	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Anti-Galektin-2	Ziege	1/100	R&D Systems
Anti-Galektin-4	Ziege	1/100	R&D Systems

Tabelle 2: Primärantikörper für die Paraffinschnitte

<i>Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-Galektin-1	Ziege	1/400	R&D Systems
Anti-Galektin-2	Ziege	1/100	R&D Systems
Anti-Galektin-4	Ziege	1/300	R&D Systems

Tabelle 3: Biotinylierte Sekundärantikörper für die Immunhistochemie

<i>Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-Ziege IgG	Kaninchen	1/300	DAKO Cytomation, Hamburg, Deutschland

Tabelle 4: Primär- und Sekundärantikörper für den Western Blot

<i>Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-Galektin-1, -2 und -4	Ziege	1/1000	R&D Systems
Anti-Ziege	Kaninchen	1/10 000	DAKO Cytomation

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Tabelle 5: Chemikalien und Verbrauchsmaterial

<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterial</i>	<i>Hersteller</i>
3-Amino-9-ethyl-carbazole (AEC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bio-Rad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Blotting Grade Non-Fat Dry Milk (Milchpulver)	Bio Rad Laboratories
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Citronensäure-1-Hydrat	Riedel de Haen, Seelze, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat	Carl-Roth KG, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser	Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland
N,N-Dimethylformamide (DMF)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	GIBCO, Eggenstein, Deutschland
0,2 M Essigsäure	Merck
Ethanol (96%, 80%, 70%,50%)	Merck
Ethanol 100%	Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Blotterpapier (Filterpapier)	VWR international, Darmstadt, Deutschland
Glyceringelatine nach Kaiser	Merck
Hämatoxylin	Merck
H ₂ O ₂ 30%	Merck
Isopropanol	Merck
Kaliumalaunsulfat (Aluminiumkaliumsulfat-Dosecahydrat)	Merck
Kaninchen-Normalserum	DAKO
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
Markierungsstift für Gewebeschnitte	DAKO
NaCl	Sigma-Aldrich

Material und Methoden

Na ₂ HPO ₄ xH ₂ O	Merck
0,2 M Natriumacetat	Merck
Natriumjodat	Merck
NP40	Roche, Mannheim, Deutschland
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel 1,5 x 10	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE® Sharp Protein Standard	Invitrogen
NuPAGE® Transfer Buffer (20x)	Invitrogen
Objektträger Super Frost® Plus	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Paraformaldehyd/PBS (pH 7) 4%	Herbeta Arzneimittel
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Polyvinylidenfluorid-Membran	Invitrogen
Röntgenfilm	Amersham, Freiburg i.Br., Deutschland
Rotihistol	Carl-Roth KG
Schwämme für XCell II™ Blotting	Invitrogen
Safe Seal Gefäß 1,5 ml	Sarstedt
Safe Seal Gefäß 2 ml	Sarstedt
SDS 10%	Sigma-Aldrich
Tissue Tek	Sakura Finetek, Staufen, Deutschland
TRIS (1M)	Merck
Tween 20	Merck
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer, Boston, MA, USA

2.1.3 Puffer und Lösungen

<u>10xPBS Stammlösung:</u>	2,0 g KCl
	80 g NaCl
	2,0 g KH ₂ PO ₄
	14 g Na ₂ HPO ₄ xH ₂ O

Material und Methoden

	mit H ₂ O dest. auf 1l auffüllen bei Raumtemperatur lagern
<u>1xPBS Gebrauchslösung</u>	100 ml 10xPBS + 900 ml H ₂ O dest.
<u>0,1 %iges BSA in PBS</u>	10 mg BSA in 10 ml 1xPBS
<u>5% iges BSA in PBS</u>	0,5 g BSA in 10ml 1xPBS
<u>ABC-Komplex-Lösung</u>	je 1 Tropfen Lösung A und Lösung B auf 5 ml 1xPBS (ABC-Kit Vectostain, Hersteller: Vector)
<u>Acetatpuffer pH 5,0</u>	70 ml 0,2 M Natriumacetat + 30 ml 0,2 M Essigsäure
<u>10xCitratpuffer (Stammlösung)</u>	42 g Citronensäure-Monohydrat in 1,8 l H ₂ O bidest. lösen und mit NaOH auf pH 6,0 einstellen
<u>1x Citratpuffer (Gebrauchslösung)</u>	100 ml 10xCitratpuffer + 900 ml H ₂ O dest
<u>AEC-Substrat</u>	1 Tablette 3-Amino-9-ethyl-carbazole + 2,5 ml DMF
<u>AEC-Entwicklerlösung</u>	3,8 ml Acetatpuffer pH 5,0 200 µl AEC-Substrat 2 µl H ₂ O ₂ anschließend wird die Lösung filtriert
<u>3 %iges H₂O₂</u>	8 ml H ₂ O ₂ + 72 ml 1xPBS
<u>Hämalaun nach Meyer</u>	0,5 g Hämatoxylin in 500 ml H ₂ O bidest. lösen, dann 0,1 g Natriumjodat 25 g Kaliumalaunsulfat (Aluminiumkaliumsulfat- Dosecahydrat) dazugeben und lösen. Die Lösung wird blauviolett. Danach 25 g Chloralhydrat 0,5 g Citronensäure-1-Hydrat dazugeben. Anschließend wird die Lösung vor der Verwendung filtriert.
<u>Western Blot Running Buffer</u>	760 ml H ₂ O dest. 40 ml NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x)
<u>Western Blot Transfer Buffer</u>	760 ml H ₂ O dest. 40 ml Transfer Buffer (20x) 200 ml Ethanol
<u>Western Blot Wash Buffer</u>	1xPBS + 1 ml Tween 20

Material und Methoden

<u>Western Blot Blocking Buffer</u>	40 ml Wash Buffer + 2 g Milchpulver
<u>Lysepuffer RIPA</u>	für 100 ml: 15 ml NaCl (1M) 5 ml TRIS (1M) 1 ml 10% SDS 1 ml NP40 74 ml H ₂ O Inhibitoren (Phosphatase- und Proteinase-Inhibitoren) frisch dazugeben in der Verdünnung 1:100 Puffer in Aliquots einfrieren bei -20°C

2.1.4 Geräte

Tabelle 6: Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
BioPhotometer®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Elektrophoresekammer XCell Sure Lock™	Invitrogen
Feinwaage FA-1104i	Faust, Meckenheim, Deutschland
Grobwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Heizblock DRI-Block® DB 3D	Techne
HERAcell 150	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold, Deutschland
Kryostat Frigocut E 2800	Reichert-Jung, Nussloch, Deutschland
Mikrotom HM355s	Microm, Walldorf, Deutschland
Mikroskop Axiophot	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop-Kamera Axio Cam HRc	Zeiss, Jena, Deutschland
Schüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Schüttler KS 250 basic	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Spannungsquelle Power Pac 200	Bio Rad Laboratories
Tischzentrifuge	neoLab®, Heidelberg, Deutschland
Vortexer REAX Control	Heidolph

2.2 Methoden

2.2.1 Immunhistochemie

2.2.1.1 Probengewinnung und Herstellung der Gefrierschnitte

Für die Gefrierschnitte wurden Biopsien aus Koloskopien und Resektate aus Operationen verwendet. Die Materialgewinnung erfolgte im Rahmen von medizinisch indizierten Eingriffen. Die Gewebeentnahme wurde von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin genehmigt. Dabei wurde Gewebe verwendet, das aus dem Dickdarm stammt, um eine bessere Vergleichbarkeit der Expressionen untereinander zu haben. Nach koloskopischer Entnahme wurden die Biopsien in Tissue Tek eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Material aus den Operationen konnte aufgrund der ausreichenden Resektatgröße ohne Tissue Tek eingefroren und erst kurz vor dem Schneiden des Gewebes eingebettet werden. Anschließend wurde das Gewebe bei -80°C gelagert bis es weiterverarbeitet wurde. Mit einem Kryostaten, einem Rotationsmikrotom in einer Kühlkammer, wurden bei einer Temperatur von -30°C $10\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Super Frost Plus® Objektträger aufgetragen und bei -80°C gelagert.

2.2.1.2 Probengewinnung und Herstellung der Paraffinschnitte

Für den Vergleich der Expression der Galektine vor und nach der Therapie mit einem TNF- α -Antikörper wurden paraffineingebettete Biopsien aus der Pathologie des Campus Charité Mitte verwendet. Dabei wurde jeweils eine Biopsie vor und eine unter der Therapie vom gleichen Patienten verwendet. Die Entnahme der paraffineingebetteten Biopsien erfolgte im Rahmen von medizinisch indizierten Koloskopien. Alle Biopsien stammen aus dem Dickdarm. Zur Herstellung der Paraffinschnitte wurde ein Mikrotom HM355s der Firma Microm verwendet. Dabei wurden die Biopsien auf $1,5\ \mu\text{m}$ Dicke geschnitten.

2.2.1.3 Vorversuche

Um die passende Verdünnung der Antikörper für die jeweilige Galektinfärbung zu verwenden, wurde in einer Verdünnungsreihe die geeignete Antikörperkonzentration ermittelt. Dabei wurde beachtet, dass die richtige Verdünnung des Primärantikörpers

erreicht ist, wenn der Antikörper die spezifischste Markierung möglichst ohne bzw. mit einer geringen Hintergrundfärbung zeigt.

2.2.1.4 Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung

In der Immunhistochemie nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten Proteinen am histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Immunologische Reaktionen zwischen Antigenen und den spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern stellen den ersten Schritt jeder immunhistologischen Färbung dar. Der zweite Schritt besteht in der Detektion der entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe durch eine Farbreaktion. Bei der direkten Methode sind die Markermoleküle (fluoreszierender Farbstoff, Enzym, kolloidales Gold), die als Ausgangspunkt oder Katalysator der Farbreaktion dienen, direkt an den spezifischen Primärantikörper gebunden. Bei der indirekten Methode, die in dieser Arbeit verwendet wurde, bindet ein nicht markierter, unkonjugierter Antikörper das spezifische Antigen der Zelle. Dieser wird dann von einem zweiten markierten Antikörper, dem sogenannten Sekundärantikörper, der die Detektion ermöglicht, gebunden. Der Sekundärantikörper bildet somit eine Brücke zwischen dem Primärantikörper und dem Avidin-Biotin-Komplex. Er ist auf der einen Seite gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet, wird aber auf der anderen Seite selbst aus einer anderen Tierspezies gewonnen. Wenn der Primärantikörper also z.B. in der Spezies Ziege hergestellt wurde, muss der Brückenantikörper gegen Ziegenimmunglobuline gerichtet sein. Der Sekundärantikörper wird dabei im Überschuss zur Reaktion gegeben. Auf diese Weise ist gewährleistet, dass nur ein Fab-Stück des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper bindet und das andere Fab-Stück jeweils für den Komplex frei bleibt. In der hier verwendeten Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) ist der Sekundärantikörper mit Biotin markiert (biotinyliert). Bei Biotin handelt es sich um ein wasserlösliches Vitamin, welches sich gut an den Sekundärantikörper koppeln lässt. Im nächsten Schritt bindet der Avidin-Biotin-Komplex an den biotinylierten Antikörper. Der Komplex wird so produziert, dass an drei von vier möglichen Bindungsstellen des Avidins, einem Hühnereiweiß-Glykoprotein, ein Molekül Biotin gebunden wird. Dabei nutzt man die Affinität von Avidin zu Biotin. Um ein Enzym, in diesem Fall die Meerrettich-Peroxidase (HRPO=Horseradish Peroxidase), welches die Farbreaktion in Gang setzt, mit einzubringen, wird das Enzym ebenfalls biotinyliert und somit an den

Komplex gebunden. Anschließend setzt die HRPO nach Zugabe eines Indikatorstoffes 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) einen rotbraunen Farbstoff um. Nun können die Antigen-bindenden Zellen anhand der Färbung erkannt werden.

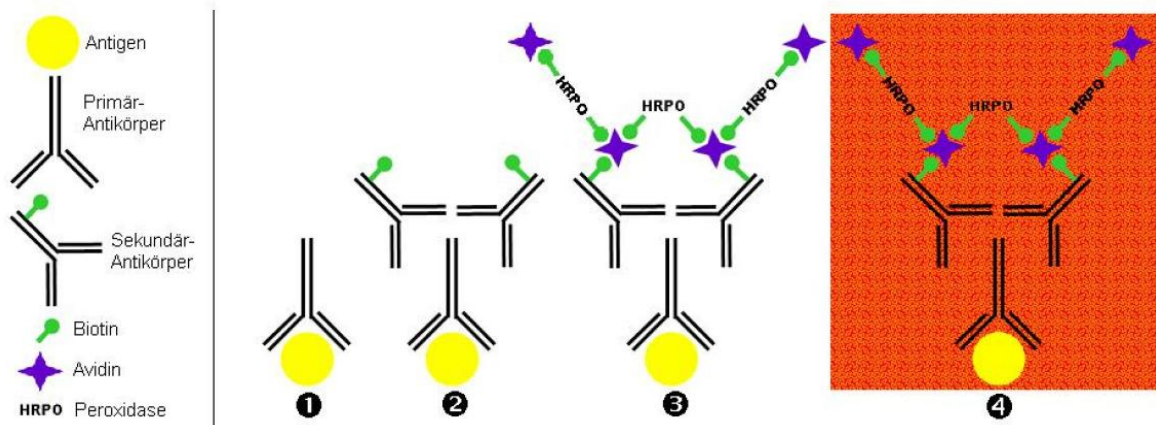


Abb. 6: Das Prinzip der Immunhistochemie. Im ersten Schritt bindet der Primärantikörper an sein Antigen. Der Sekundärantikörper bildet die Brücke zwischen dem Primärantikörper und dem Avidin-Biotin-Komplex, dem Detektionssystem. Nach Zugabe des Indikatorstoffes AEC setzt die Meerrettich-Peroxidase einen rotbraunen Farbstoff um, an dem die Antigen-bindenden Zellen erkannt werden können (Quelle: Schmidt, ED: Vergleich der Expressionen verschiedener Matrixproteine und Entzündungsmediatoren in HUVEC-Fibrochondrozyten-Cokulturen und Fibrochondrozyten-Monokulturen, unv. Dissertation, Universität Tübingen 2007 [53]).

2.2.1.5 Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten

Die Schnitte wurden nach dem Auftauen mit einem Fettstift umrandet, um den Antikörperverbrauch möglichst gering zu halten. Anschließend wurden die Objektträger mit dem jeweiligen verwendeten Primärantikörper und der Antikörperkonzentration beschriftet. Zur Fixierung des Gewebes auf dem Objektträger wurden die Schnitte bei Raumtemperatur (RT) für 20 min in 4 %iger Paraformaldehyd/PBS (pH 7)-Lösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 min wurden die Schnitte bei RT für 10 min mit 3 %igen H_2O_2 in PBS inkubiert. Ziel dieses Schrittes ist die Blockierung der endogenen Peroxidase. Man gibt das H_2O_2 dabei im Überschuss auf das Gewebe und verhindert auf diese Weise die unerwünschte Reaktion des Chromogens mit der endogenen Peroxidase des Gewebes. Anschließend wurden die Schnitte dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Es erfolgte nun eine 30-minütige Inkubation mit einer Blockierungslösung in einer feuchten Kammer. Für Galektin-1 wurde

Kaninchenserum (Verdünnung 1/20) und für Galektin-2 und Galektin-4 5 %iges bovines Serumalbumin (BSA) in PBS verwendet. Das „Normalserum“ dient dabei zur Absättigung von elektrostatischen Ladungen und verhindert unspezifische Bindungen. Die Schnitte wurden nun für zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Primärantikörper wurde dabei in gewünschter Konzentration mit 0,1 %igen BSA in PBS verdünnt. Danach wurde dreimal 5 min mit PBS gewaschen, um überschüssige Primärantikörperlösung zu entfernen. Es folgte die Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers in der jeweiligen Konzentration für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Nach dreimal 5-minütigem Waschen mit PBS wurde die ABC-Lösung auf die Schnitte gegeben und für 30 min inkubiert. Es folgte anschließend ein weiterer Waschschriff mit dreimal 5 min. Nach Zugabe der AEC-Entwicklerlösung wurden die Schnitte unter dem Mikroskop beobachtet und nach Entwicklung einer Farbreaktion in Aqua dest. gestoppt. Die Zellkerne wurden anschließend mit Hämalaun für 4 min gegengefärbt. Für 10 min wurde mit Leitungswasser gebläut und mit Glyceringelatine eingedeckt.

2.2.1.6 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten

Als ersten Schritt wurden die Objektträger mit dem jeweiligen verwendeten Primärantikörper und der Antikörperkonzentration beschriftet. Dann erfolgte das Trocknen der Schnitte für 15 min bei 70°C. Anschließend wurden die Schnitte mit Rotihistol für zweimal 10 min entparaffiniert. Es folgte die Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe mit je 5 min in Isopropanol, 96%igem, 80%igem, 70%igem und 50%igem Ethanol. Anschließend wurde zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Die durch die Formalinfixierung verursachte Proteinvernetzung wurde nun durch Erhitzen der Schnitte in einem handelsüblichen Schnellkochtopf in Citratpuffer für 3 min wieder aufgehoben. Die Schnitte wurden anschließend zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Nach einer Inkubation von 10 min mit 3 %igem H₂O₂ erfolgte ein nächster Waschschriff mit zweimal 5 min PBS. Die Schnitte wurden nun mit einer Blockierungslösung in einer feuchten Kammer inkubiert. Für Galektin-1 und -2 wurde zum Blocken Kaninchen-Normalserum (Verdünnung 1/20) und für Galektin-4 5 %iges BSA in PBS verwendet. Nach zweimal 5-minütigen Waschen wurden die Schnitte mit dem 1. Antikörper für 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Primärantikörper

wurde dafür in gewünschter Konzentration mit 0,1 %igem BSA in PBS verdünnt. Danach wurde viermal 5 min mit PBS gewaschen, um überschüssige Primärantikörperlösung zu entfernen. Es folgte die Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers in der jeweiligen Konzentration für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer. Nach 5-minütigem Waschen mit PBS wurde die ABC-Lösung auf die Schnitte gegeben und für 30 min inkubiert. Nach weiterem zweimaligem Waschen wurde die AEC-Entwicklerlösung auf die Schnitte gegeben. Die Schnitte wurden unter dem Mikroskop beobachtet und nach Entwicklung einer Farbreaktion in Aqua dest. gestoppt. Anschließend wurden die Zellkerne mit Hämalaun für 4 min gegengefärbt. Für 10 min wurde mit Leitungswasser gebläut und mit Glyceringelatine eingedeckt.

2.2.1.7 Kontrollen für die immunhistochemische Färbung

Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers ausschließen zu können, wurde für jede Färbung und jeden Schnitt eine Negativkontrolle mitgeführt. Hierfür wurden während des Schneidevorgangs des Gewebes zwei Schnitte auf einen Objektträger aufgetragen. Im Rahmen der immunhistochemischen Färbung wurde nur auf eine der beiden Schnitte der jeweils gewünschte Primärantikörper aufgetragen. Auf den anderen Schnitt wurde 0,1%iges BSA in PBS aufgetragen. Alle weiteren Schritte des Protokolls waren identisch. Somit konnte eine unspezifische Bindung des 2. Antikörpers überprüft werden. Im Falle einer positiven Färbung in der Negativkontrolle wurde die Färbung nicht gewertet.

2.2.1.8 Photographische Dokumentation und Auswertung der Gewebeschnitte

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden unter dem Mikroskop Axioskop betrachtet (Zeiss, Deutschland) und die photographische Dokumentation erfolgte mit einer Axiocam (Zeiss). Dabei wurde die Software AxioVision Rel. 4.7 verwendet.

Die Anfertigung der Graphen und die statistische Auswertung erfolgten mit GraphPad Prism® 5 (San Diego, CA). Für die statistische Auswertung wurde der Mann-Whitney-Test für unpaare, nicht-normalverteilte Größen verwendet. Alle angegebenen p-Werte sind zweiseitig mit signifikanten Werten bei $p < 0.05$.

Es wurden zwei Aspekte bei der Auswertung der Gewebeschnitte analysiert. Einmal wurden die Intensitäten der angefärbten Zellen der Lamina epithelialis ausgewertet. Ferner konnten Immunzellen in der Lamina propria detektiert werden, die Galektin exprimieren. Diese wurden ebenfalls ausgewertet.

B) Auswertung der Lamina epithelialis

Die Auswertung der Lamina epithelialis erfolgte semiquantitativ. Die Einteilung erfolgte anhand der Intensitäten der angefärbten Epithelzellen. Es wurden die Werte 0 bis 3 für die Intensitätseinteilung verwendet in Anlehnung an vorausgehende, etablierte immunhistochemische Auswertungen (Remmele *et al.* 1986 [54]).

Tabelle 7: Gradeinteilung zur semiquantitativen Auswertung der Galektinexpression in der Epithelschicht

Grad	Immunhistologisches Bild
0	keine Expression
1	leichte Expression
2	mittlere Expression
3	starke Expression

Im Folgenden sind Referenzschnitte für die Bewertung der histologischen Schnitte dargestellt (Abb. 7).

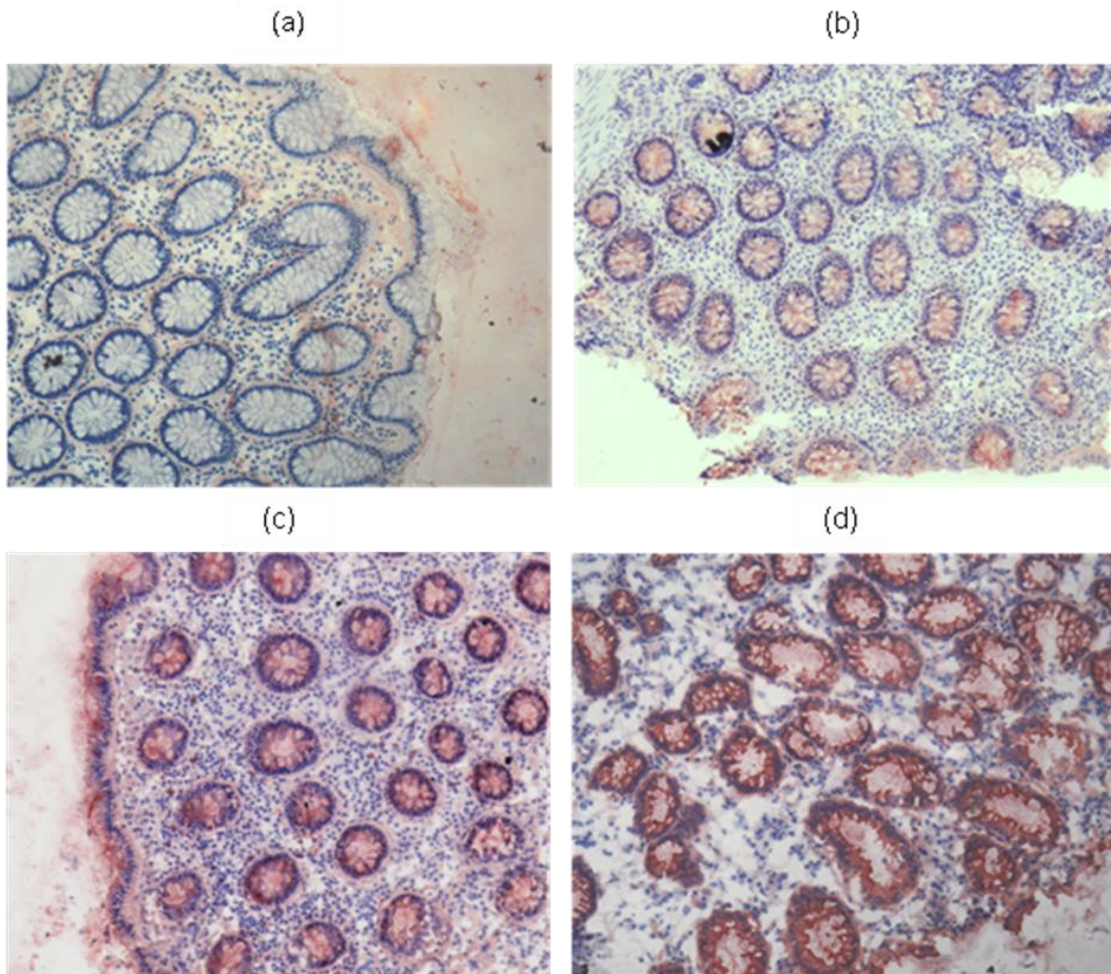


Abb. 7: Referenzschnitte der semiquantitativen Auswertung der Galektin-Expression in der Epithelschicht: (a) Intensität Grad 0 (b) Grad 1 (c) Grad 2 (d) Grad 3. Fotos wurden unter 100facher Vergrößerung aufgenommen.

B) Auswertung der Galektin-exprimierenden Immunzellen in der Lamina propria

In der Lamina propria konnten Immunzellen detektiert werden, die Galektin exprimieren. Um diese quantitativ auswerten zu können, wurden von jeweils einer Biopsie Fotos (400fache Vergrößerung) aus dem Bereich der Lamina propria hergestellt. Die Fotos wurden in Originalgröße in Power Point eingefügt. Ein Quadrat aus 4,5 cm mal 4,5 cm wurde in den Bereich, wo sich Galektin-exprimierende Immunzellen befinden, eingefügt. Dabei konnten Galektin-positive Immunzellen in den Bereichen eines Entzündungsinfiltrates detektiert werden. In diesem definierten Bereich wurde der prozentuale Anteil der positiven, Galektin-exprimierenden Immunzellen errechnet. Dabei wurden die Zellen, die im Randbereich angeschnitten waren, nicht mit in die Zählung aufgenommen. Aus jeweils drei repräsentativen Bereichen wurde anschließend

der Mittelwert aus den Prozenten errechnet. Die Angaben im Ergebnisteil repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung.

2.2.2 Erhebung von klinischen Daten des Patientenkollektivs

2.2.2.1 Bestimmung des klinischen Aktivitätsindex bei den Patienten mit Morbus Crohn

Durch Aktenrecherche im Archiv der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie am Virchow Klinikum Berlin wurden für 10 Patienten mit Morbus Crohn die jeweiligen klinischen Aktivitätsindizes errechnet, um zu untersuchen, ob es einen Unterschied in der Expression der Galektine in Hinblick auf den klinischen Aktivitätsindex gibt. Dabei bezieht sich der klinische Aktivitätsindex auf den jeweiligen Zeitpunkt der Probenentnahme. Der Crohn's Disease Activity Index (CDAI) nach Best *et al.* [55] dient der Quantifizierung der Krankheitsaktivität. Er setzt sich aus acht Faktoren zusammen, die jeweils mit einem Faktor multipliziert und dann summiert werden. Die Komponenten des CDAI und ihre Gewichtungsfaktoren sind wie folgt:

Tabelle 8: Berechnung des CDAI nach Best *et al.* 1976 [55]

Klinische oder laborchemische Variable	Gewichtungsfaktor
Anzahl der ungeformten Stuhlgänge in den letzten sieben Tagen	x 2
Bauchschmerzen (0=keine, 1=leicht, 2=mittel, 3=stark) als Summe der letzten sieben Tage	x 5
Allgemeinbefinden (0=gut, 1=beeinträchtigt, 2=schlecht, 3=sehr schlecht, 4=unerträglich) als Summe der letzten sieben Tage	x 7
Anwesenheit von Komplikationen *	x 20
Symptomatische Durchfallbehandlung (Loperamid o.ä.)	x 30
Abdominelle Resistenz (0=nein, 2=fraglich, 5=sicher)	x 10
Abweichung des Hämatokrit von 47 % bei Männern und 42 % bei Frauen	x 6
Prozentuale Abweichung vom Standardgewicht	x 1

Material und Methoden

* Je ein Punkt wird addiert für jede der folgenden Komplikationen:

- Gelenkbeteiligung (Gelenkschmerzen oder Arthritis)
- Augenbeteiligung (Iritis oder Uveitis)
- Hautbeteiligung (Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, oder orale Aphthen)
- perianaler Befall (Analfissur, perianale Fistel oder perianale Abszesse)
- andere Fisteln
- erhöhte Körpertemperatur ($>37,7$ °C) während der letzten sieben Tage.

Die Einteilung des Aktivitätsindex erfolgt dann anhand der folgenden CDAI-Werte:

- CDAI < 150 Punkte: Remission
- CDAI ≥ 150 Punkte: klinische Aktivität

Die folgende Tabelle zeigt einen Überblick über das Patientenkollektiv mit der Diagnose eines Morbus Crohn, welches einen CDAI unter 150 zum Zeitpunkt der Probenentnahme aufweist und sich somit definitionsgemäß in einer Remission befand.

Tabelle 9: Patienten mit Morbus Crohn mit einem CDAI < 150 (Remission)

PATIENT	ALTER	GEWEBEART	DIAGNOSE	CDAI
P 23	41	Resektat	Morbus Crohn	20
P 26	26	Biopsie	Morbus Crohn	117
P 44	43	Biopsie	Morbus Crohn	105
P 59	30	Biopsie	Morbus Crohn	147

Die folgende Tabelle zeigt einen Überblick über das Patientenkollektiv mit der Diagnose eines Morbus Crohn, welches einen CDAI ≥ 150 zum Zeitpunkt der Probenentnahme aufweist und sich definitionsgemäß in mindestens einer leichten bis mittleren klinischen Aktivität befand:

Tabelle 10: Patienten mit Morbus Crohn mit einem CDAI \geq 150 (klinische Aktivität)

PATIENT	ALTER	GEWEBEART	DIAGNOSE	CDAI
P 01	58	Resektat	Morbus Crohn	170
P 30	37	Biopsie	Morbus Crohn	186
P 31	33	Biopsie	Morbus Crohn	241
P 64	31	Biopsie	Morbus Crohn	271
P 69	20	Biopsie	Morbus Crohn	244
P 50	47	Biopsie	Morbus Crohn	191

2.2.2.2 Bestimmung des klinischen Aktivitätsindex bei den Patienten mit Colitis ulcerosa

Wie bei den Patienten mit einem Morbus Crohn wurde durch Aktenrecherche der klinische Aktivitätsindex („clinical activity index“, CAI, nach Rachmilewitz 1989 [56]) von 10 Patienten mit der Diagnose einer Colitis ulcerosa berechnet. Dabei bezieht sich der CAI wie der CDAI auf den Zeitpunkt der entsprechenden Probenentnahme.

Tabelle 11: Berechnung des CAI nach Rachmilewitz 1989 [56]

<i>Kriterium</i>		<i>Punktwert</i>
1. Anzahl der Stühle pro Woche	<18	0
	18-35	1
	36-60	2
	>60	3
2. Blut im Stuhl (Wochenmittel)	keines	0
	wenig	1
	viel	2
3. Einschätzung des Befindens (Untersucher)	gut	0
	durchschnittlich	1
	schlecht	2
	sehr schlecht	3
4. Abdominelle Schmerzen	keine	0
	leicht	1

Material und Methoden

	mittel	2
	starke	3
5. Temperatur (Colitis-assoziiert)	37-38°C	0
	>38°C	3
6. Extraintestinale Manifestationen	Iritis	3
	Erythema nodosum	3
	Arthritis	3
7. Laborwerte	BSG > 50 mm nach 1. Std.	1
	BSG > 100 mm nach 1. Std	2
	Hämoglobin < 100 g/l	4

Anschließend werden die Punktwerte zusammenaddiert. Besteht ein Punktwert über 5 spricht man definitionsgemäß von einer aktiven Erkrankung. In Remission befindet sich der Patient bei einem CAI ≤ 5 . Folgende Tabelle zeigt einen Überblick über die Patienten mit der Diagnose einer Colitis ulcerosa, die einen CAI ≤ 5 hatten.

Tabelle 12: Patienten mit Colitis ulcerosa mit einem CAI ≤ 5 (Remission)

PATIENT	ALTER	DIAGNOSE	GEWEBEART	CAI
P 03	63	therapierefraktäre Pancolitis ulcerosa	Resektat	3
P 24	21	Colitis ulcerosa	Biopsie	1
P 32	25	Colitis ulcerosa	Biopsie	4
P 35	46	Colitis ulcerosa	Biopsie	4
P 36	37	Colitis ulcerosa	Biopsie	2

Folgende Tabelle zeigt einen Überblick über die Patienten mit der Diagnose einer Colitis ulcerosa, die einen CAI > 5 hatten.

Tabelle 13: Patienten mit Colitis ulcerosa mit einem CAI >5 (aktive Erkrankung)

PATIENT	ALTER	DIAGNOSE	GEWEBEART	CAI
P 09	28	therapieresistente Colitis ulcerosa	Resektat	6
P 10	51	therapieresistente CU	Resektat	6
P 11	23	therapieresistente CU	Resektat	6
P 22	30	therapieresistente CU	Resektat	6
P 95	35	Colitis ulcerosa	Resektat	6

2.2.3 Western Blot

2.2.3.1 Proteinextraktion

Es wurden Zelllysate der epithelialen Zelllinien HT-29 und Caco-2 für den Western Blot hergestellt, um die intestinale Expression von Galektin-1, -2 und -4 untersuchen zu können. Es handelt sich dabei um kultivierte, adhärenz Zellen eines kolorektalen Adenokarzinoms.

Das Nährmedium der vorher kultivierten Zellkulturen wurde abgesaugt. Die Zellen wurden zweimal mit vorgewärmtem PBS (37°C) gewaschen, um das fetale Kälberserum (FCS), das in den Nährmedien der Zellkultur enthalten ist, herauszuwaschen. Das PBS wurde anschließend wieder abgesaugt. Es wurde 2 ml vorgewärmtes (37°C) Trypsin (0,5 %) auf die Zellen gegeben, damit sie sich vom Boden lösen (Detachment). Nach 5-minütiger Inkubation mit Trypsin im Brutschrank konnten die Zellen mit vorgewärmtem PBS (37°C) von der Kulturflasche abgewaschen und in ein 15 ml Falcon Röhrchen mit 10 ml Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) überführt werden. Nach dem Zentrifugieren (1500 rpm, 5 min) wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden zunächst in 1 ml DMEM resuspendiert und einige Male vorsichtig hoch und runter pipettiert, um die Zellen zu vereinzeln. Es wurde dann mit DMEM auf 10 ml aufgefüllt.

Für die Zellyse wurden anschließend 3×10^6 Zellen verwendet. Dazu wurde das nach Zentrifugation entstandene Pellet mit 100 µl Lyse-Puffer resuspendiert. Es wurden Protease- und Phosphatase-Inhibitoren in der Verdünnung 1:100 dazugegeben. Die Probe wurde gevortext, 20 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (14000rpm, 4°C, 10 min). Der Überstand konnte dann entnommen und bei -20 °C gelagert werden.

2.2.3.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Bio-Rad Protein-Assay. Der Assay beruht auf dem Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford [57]. Beim Bradford-Test erfolgt der quantitative Nachweis der Proteine mithilfe des Farbstoffs Coomassie-Brilliantblau G-250. Dieser lagert sich v. a. an basische und unpolare Seitenketten von Proteinen an, wobei insbesondere Wechselwirkungen mit der Aminosäure Arginin von Bedeutung sind. Im sauren Milieu führt diese Komplexbildung zwischen Protein und Farbstoff zur Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs. Es wurde hierfür ein Fertigreagenz (Bio-Rad Protein-Assay) verwendet, bestehend aus Coomassie Blue, Phosphorsäure und Methanol.

Während nun ungebundenes Coomassie-Brilliantblau G-250 ein Absorptionsmaximum von 465 nm aufweist, besitzt der Protein-Farbstoff-Komplex ein Absorptionsmaximum von 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm korreliert wiederum mit der Proteinkonzentration der zu untersuchenden Lösung und kann photometrisch bestimmt werden.

Im 1. Ansatz wurden 1 ml Bio Rad Protein-Assay Lösung + 2 µl Lysepuffer eingesetzt, um bei einer Wellenlänge von 595 nm einen Nullwert zu messen. Um die im Photometer gemessene Absorption der zu untersuchenden Lösung einer bestimmten Proteinkonzentration zuordnen zu können, wurde ein Standardprotein mit einer definierten Proteinkonzentration verwendet. Aus diesem Grund wurden im 2. Ansatz 1 ml Bio Rad Protein-Assay Lösung + 2 µl BSA (1mg/1ml) eingesetzt und als Standard verwendet. Der 3. Ansatz besteht aus der eigentlichen Probe: 1 ml Bio Rad Protein-Assay Lösung + 2 µl Proteinlösung.

2.2.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nach Auftauen der Zellysate wurden 20 µg Protein mit 5 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer für eine Proteinprobe vermischt. Anschließend wurden die Proben für 5 min in einen auf 95 °C vorgeheizten Heizblock gestellt. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate, SDS) denaturiert dabei durch Binden an die Aminosäurereste die Proteine. Dadurch entstehen SDS-Protein-Komplexe, deren Nettoladung nur von den anionischen SDS-Molekülen bestimmt wird.

Somit kann eine Trennung der Proteine im elektrischen Feld nach Größe und unabhängig von der Eigenladung der Proteine erreicht werden. Für die Proteinauftrennung wurde ein Gradientengel verwendet, das unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid (4-12 %) über den gesamten Trennungsbereich aufweist und so ein sehr breites Größenspektrum von Proteinen abdecken kann. Das Gel wurde senkrecht in die Elektrophoresekammer eingesetzt und nach Entfernen des Kamms aus dem Gel wurden die Kammern mit Running Buffer befüllt. Wenn sich Luftblasen auf dem Running Buffer gebildet haben, wurden diese mit einer Pipette entfernt. Nun wurde die erste Geltasche mit einem gefärbten Molekulargewichtsmarker gefüllt. Dieser Marker ermöglicht eine Größenbestimmung der zu analysierenden Proteine. Die restlichen Geltaschen wurden mit den jeweiligen Proteinproben gefüllt. Anschließend wurde für 1 Stunde eine Spannungsquelle von 180 Volt angelegt. Dabei wandern die Proteine vom Plus- zum Minuspol entsprechend ihrer Größe.

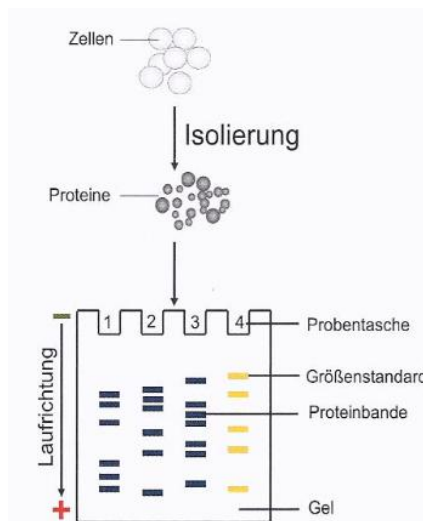


Abb. 8: Schematische Darstellung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Proteine wandern entsprechend ihrer Größe vom Plus- zum Minuspol. Ein Laufmarker wird mitgeführt, um eine Größenbestimmung der zu analysierenden Proteine durchführen zu können (Quelle: Joppien *et al.* 2011: Experimentelle Doktorarbeit. München: Elsevier [58]).

2.2.3.4 Western Blot

Um die elektrophoretisch getrennten Proteine nachweisen zu können, wurden sie auf eine Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran übertragen. Als erstes wurden dafür fünf Schwämme und zwei Blotting Papiere (Filterpapiere) für 5 min in Transfer Buffer eingelegt. Die Membran wurde für 1 min in Ethanol und anschließend ebenfalls für 5 min in Transfer Buffer getaucht. Nun wurden die jeweiligen Komponenten zwischen

Anode und Kathode aufgebaut: 2 Schwämme, Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier, 3 Schwämme. Dabei war es wichtig, dass sich zwischen Membran und Gel keine Luftblasen befanden. Anschließend wurde die innere Kammer mit Transfer Buffer und die äußere Kammer zur Kühlung mit H₂O dest. aufgefüllt. Zwischen Kathode und Anode wurde nun eine Spannung von 30 Volt für eine Stunde angelegt. Nach dem Übertragen der Proteine auf die PVDF-Membran wurde die Membran in einer 5 %igen Milchlösung (Blockierungslösung 40ml Wash Buffer + 2 g Milchpulver) über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Dadurch werden unspezifische Bindungen geblockt.

2.2.3.5 Detektion mit Antikörpern und Entwicklung

Die Milch wurde entfernt und die PVDF-Membran mit dem primären Antikörper (gelöst in 15 ml 5 %ige Milch) für eine Stunde bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal kurz mit 25 ml Wasch Buffer und einmal 15 min sowie zweimal 5 min auf dem Schüttler gewaschen. Die Membran wurde nun mit dem sekundären Antikörper inkubiert (20 ml Blockierungslösung + 2 µl Sekundärantikörper). Anschließend wurde wie nach der Inkubation mit dem primären Antikörper gewaschen. Der Waschpuffer wurde entfernt. Zur Detektion wurde ein Chemilumineszenzverfahren verwendet. Dazu wurde das chemilumineszente Substrat auf die Membran gegeben und für 5 min im Dunkeln auf dem Schüttler geschwenkt. Danach wurde die Membran in der Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm gelegt und dieser wurde anschließend entwickelt.

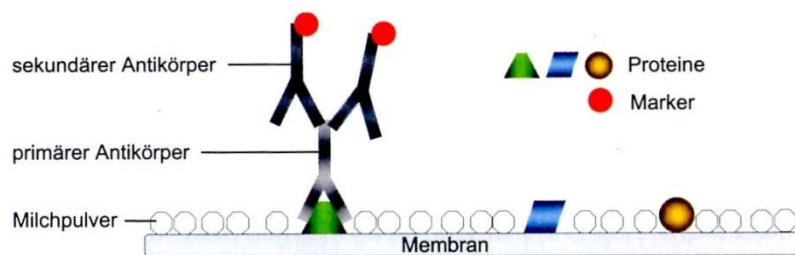


Abbildung 9: Proteinnachweis durch spezifische Antikörper. Der primäre Antikörper bindet spezifisch an sein Antigen, das zu analysierende Protein. Der sekundäre Antikörper bildet die Brücke zwischen dem primären Antikörper und dem Marker, der für die Detektion des Proteins verantwortlich ist (Quelle: Joppien *et al.* 2011: Experimentelle Doktorarbeit. München: Elsevier [58]).

3 ERGEBNISSE

Wesentlicher Träger der intestinalen Integrität ist das Epithel, das als eine hochselektive Barriere funktioniert, welches das Eindringen von Antigenen in das mukosale Immunsystem verhindern und gleichzeitig die Aufnahme von Nährstoffen gewährleisten muss [3]. Aus diesem Grund war es in dieser Arbeit von besonderer Bedeutung, die Expression der Galektine in der Epithelschicht zu untersuchen.

In allen verwendeten Proben konnte keine epitheliale Galektin-1-Expression nachgewiesen werden. Galektin-1 wurde hauptsächlich vom Bindegewebe, Muskelzellen, aber auch Immunzellen, die sich in der Lamina propria befanden, exprimiert. Galektin-2 und -4 zeigten im Gegensatz hierzu ein vorwiegend epitheliales Expressionsmuster. Es konnte ausschließlich eine cytoplasmatische Expression der Galektine in den Epithelzellen detektiert werden.

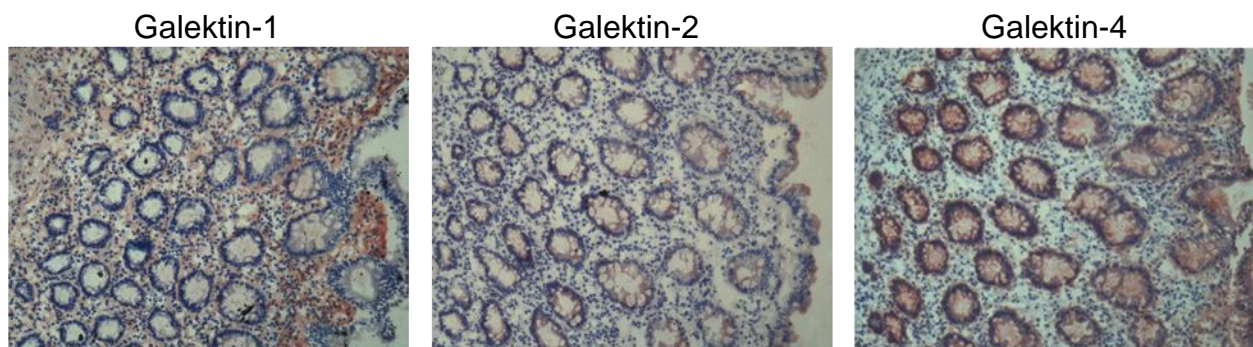


Abb. 10: Intestinale Expression von Galektin-1, -2 und -4. Galektin-1 konnte nicht in der Epithelzellschicht detektiert werden. Es wurde vor allem vom Bindegewebe, von Muskelzellen und Immunzellen in der Lamina propria exprimiert. Galektin-2 und -4 zeigten im Gegensatz hierzu ein vorwiegend epitheliales Expressionsmuster. Es wurde die ABC-Methode mit dem Indikatorstoff AEC verwendet, wodurch die Proteinexpression in einem rotbraunen Farbstoff detektiert wird. Fotos wurden unter 100facher Vergrößerung aufgenommen.

Neben den Epithelzellen, die eine starke Expression an Galektin-2 und -4 aufwiesen, konnte ebenfalls eine Expression von Galektin-1, -2 und -4 in den Immunzellen der Lamina propria festgestellt werden (Abb. 11). Dabei konnten Galektin-exprimierende Immunzellen in Bereichen eines Entzündungsinfiltrates detektiert werden.

Ergebnisse

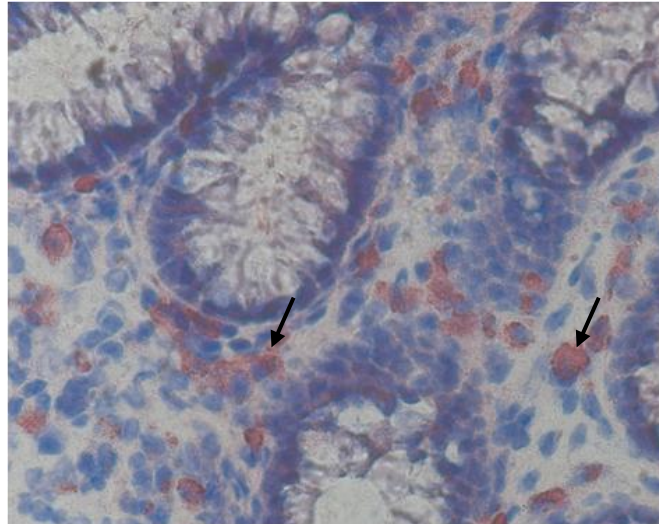


Abb. 11: Repräsentatives Bild der Galektin-exprimierenden Immunzellen in der Lamina propria (Pfeile). Fotos wurden unter 400facher Vergrößerung aufgenommen.

3.1 Vergleich der intestinalen Galektin-Expression von Patienten mit CED zur Kontrollgruppe

Es wurde von insgesamt 20 Patienten mit CED die Galektin-Expression im Dickdarm im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe untersucht. Dabei hatten 10 Patienten die Diagnose eines Morbus Crohn und 10 Patienten die Diagnose einer Colitis ulcerosa. Als Kontrolle wurden 10 Proben aus nicht entzündetem Gewebe von Patienten ohne CED verwendet. Es sollte in diesem ersten Schritt die Frage untersucht werden, ob sich die intestinale Galektinexpression in der Entzündung verglichen zum gesunden Dickdarm unterscheidet. Zunächst wurde die Expression in der Epithelzellschicht entsprechend einem semiquantitativen Intensitätsscore ausgewertet (s. 2.2.1.8). Ferner wurde der prozentuale Anteil an Galektin-exprimierenden Immunzellen in der Lamina propria bestimmt (s. 2.2.1.8).

3.1.1 Auswertung der Lamina epithelialis

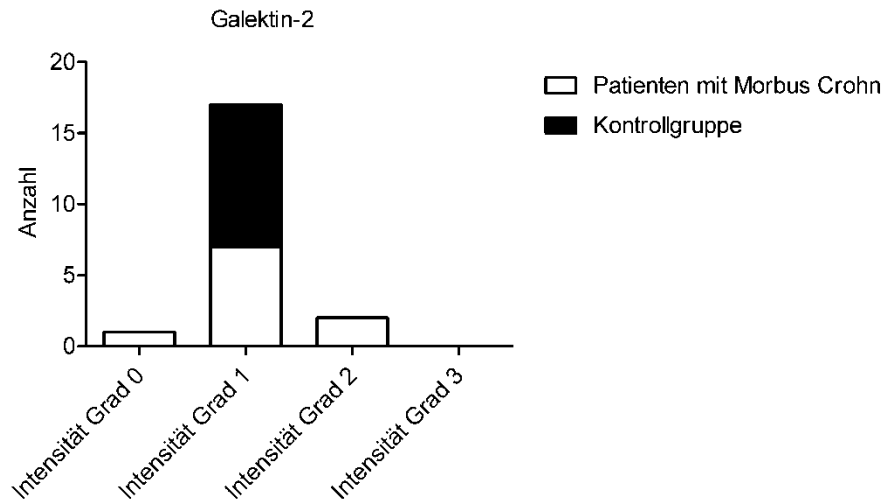


Abb. 12: Galektin-2-Expression in der Lamina epithelialis bei Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe

Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe zeigt sich bei den Patienten mit Morbus Crohn keine einheitliche, epitheliale Expressionsstärke von Galektin-2 (Abb. 12). Bei einem Patienten wurde eine verminderte, bei 7 eine gleiche und bei 2 eine gesteigerte Expression verglichen zur Kontrolle detektiert. Im Gegensatz dazu zeigte die Kontrollgruppe eine einheitlich leichte Expression.

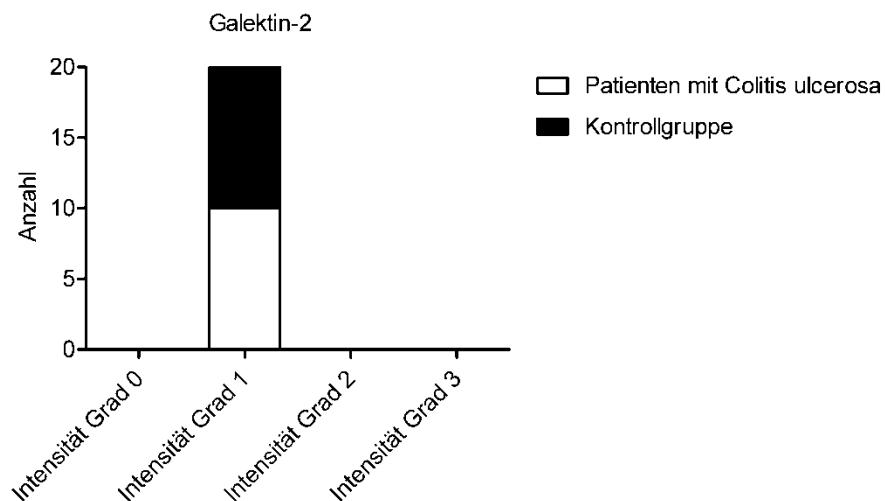


Abb. 13: Galektin-2-Expression in der Lamina epithelialis bei Patienten mit Colitis ulcerosa im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe

Ergebnisse

Bei den Patienten mit Colitis ulcerosa konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe kein Unterschied in der Galektin-2-Expression festgestellt werden (Abb. 13). Beide Gruppen zeigten eine leichte Expression.

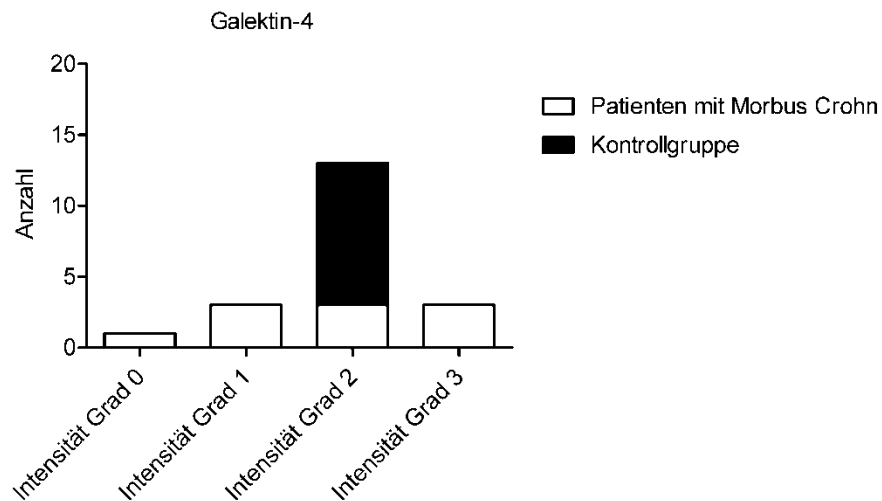


Abb. 14: Galektin-4-Expression in der Lamina epithelialis bei Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe

Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe zeigte sich bei den Patienten mit einem Morbus Crohn keine einheitliche Expressionsstärke von Galektin-4 (Abb. 14). In 4 von 10 Proben konnte eine verringerte Expression verglichen zur Kontrolle detektiert werden. Dabei wurde bei einem Patienten keine und bei 3 Patienten eine leichte Galektin-4-Expression untersucht. Ferner zeigten jeweils 3 Patienten eine gleiche und eine gesteigerte Expression verglichen zur Kontrolle.

Ergebnisse

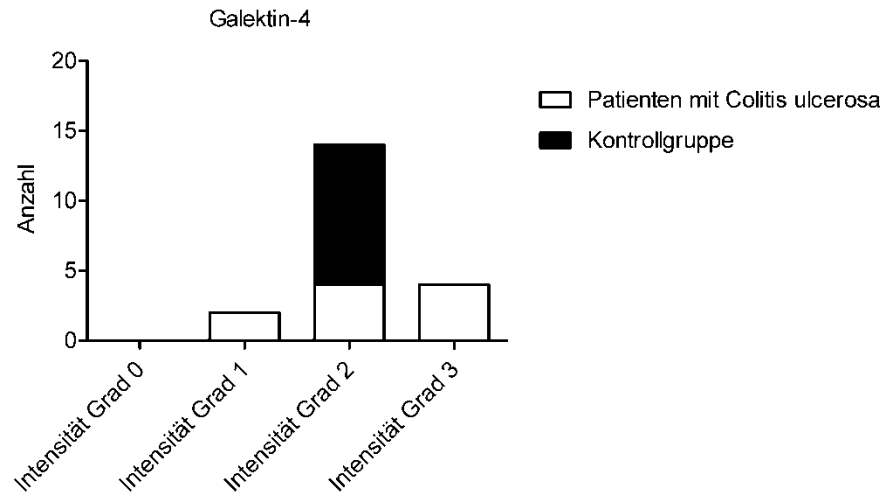


Abb. 15: Galektin-4-Expression in der Lamina epithelialis bei Patienten mit Colitis ulcerosa im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe

Die Analyse der epithelialen Galektin-4-Expression ergab bei den Patienten mit Colitis ulcerosa keine einheitliche Expressionsstärke (Abb. 15). Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe wurden bei 2 Patienten eine verminderte und bei jeweils 4 eine gleiche und eine gesteigerte Expression untersucht.

3.1.2 Auswertung der Galektin-exprimierenden Immunzellen in der Lamina propria

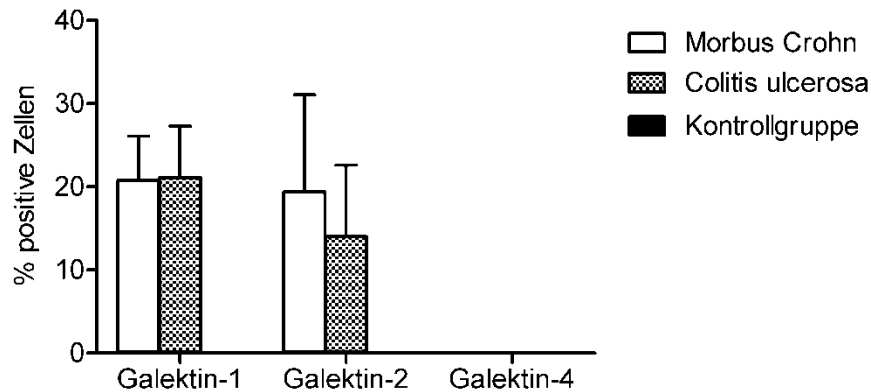


Abb. 16: Galektin-exprimierende Immunzellen in der Lamina propria. Verglichen zur Kontrolle konnten Galektin-1- und -2-exprimierende Immunzellen nur bei den Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa detektiert werden. Galektin-4 wurde von den Immunzellen nicht exprimiert. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm Standardabweichung der Patienten, bei denen positive Zellen in der Lamina propria untersucht wurden.

A) Galektin-1

Bei den Patienten mit Morbus Crohn konnten bei einem von 10 Patienten Galektin-1-exprimierende Immunzellen in der Lamina propria detektiert werden. Dabei waren $20,8 \pm 5,3$ % der Zellen positiv (Abb. 16).

Bei den Patienten mit Colitis ulcerosa konnten bei 4 von 10 Patienten Galektin-1-exprimierende Immunzellen bestimmt werden. Dabei waren $21,1 \pm 6,2$ % positive Zellen vorhanden (Abb. 16).

In der gesunden Kontrollgruppe konnten keine Galektin-1-exprimierenden Immunzellen detektiert werden.

B) Galektin-2

Bei den Patienten mit Morbus Crohn konnten bei 3 von 10 Patienten Galektin-2-exprimierende Immunzellen detektiert werden. Es waren $19,4 \pm 11,7$ % der Zellen positiv (Abb. 16).

Bei den Patienten mit Colitis ulcerosa konnten bei 4 von 10 Patienten Galektin-2-exprimierende Immunzellen detektiert werden. Es waren $14 \pm 8,6$ % positiv (Abb. 16).

Ergebnisse

Die gesunde Kontrollgruppe wies keine Galektin-2-exprimierenden Immunzellen auf. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit CED und der gesunden Kontrollgruppe ($P=0,0407$).

C) Galektin-4

Galektin-4 wurde nicht von Immunzellen exprimiert.

3.2 Untersuchung zur intestinalen Galektin-Expression in Assoziation mit dem klinischen Aktivitätsindex

Für die Berechnung der Krankheitsaktivität wurden der CDAI für die Patienten mit Morbus Crohn und der CAI für die Patienten mit Colitis ulcerosa verwendet (s. 2.2.2). Es handelt dabei um zwei verschiedene Scores, in denen klinische Symptome, wie Stuhlfrequenz, abdominelle Schmerzen und das Allgemeinbefinden, sowie Laborparameter bewertet werden. Es wurde von insgesamt 20 Patienten mit CED die Galektin-Expression in Assoziation mit dem klinischen Aktivitätsindex analysiert. Dabei hatten 10 Patienten die Diagnose eines Morbus Crohn. Bei den in Remission befindenden Patienten konnte ein durchschnittlicher CDAI von $99,8 \pm 57,6$ untersucht werden. In klinischer Aktivität wurde ein CDAI von $217 \pm 40,2$ detektiert. 10 Patienten hatten die Diagnose einer Colitis ulcerosa, wobei im Zustand der Remission der CAI bei $2,8 \pm 1,3$ Punkten lag. Während der klinischen Aktivität wurde ein einheitlicher CAI von 6 untersucht. Der jeweilige klinische Aktivitätsindex bezieht sich dabei auf den Tag der Probenentnahme. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden ausschließlich Biopsien aus dem Dickdarm verwendet.

Hierbei sollte die Frage untersucht werden, ob sich die intestinale Galektin-Expression während der klinischen Aktivität verglichen zum Zustand der Remission unterscheidet. Zunächst wurde die Expression in der Epithelzellschicht entsprechend einem semiquantitativen Intensitätsscore ausgewertet (s. 2.2.1.8). Ferner wurde der prozentuale Anteil an Galektin-exprimierenden Immunzellen in der Lamina propria bestimmt (s. 2.2.1.8).

3.2.1 Auswertung der Lamina epithelialis

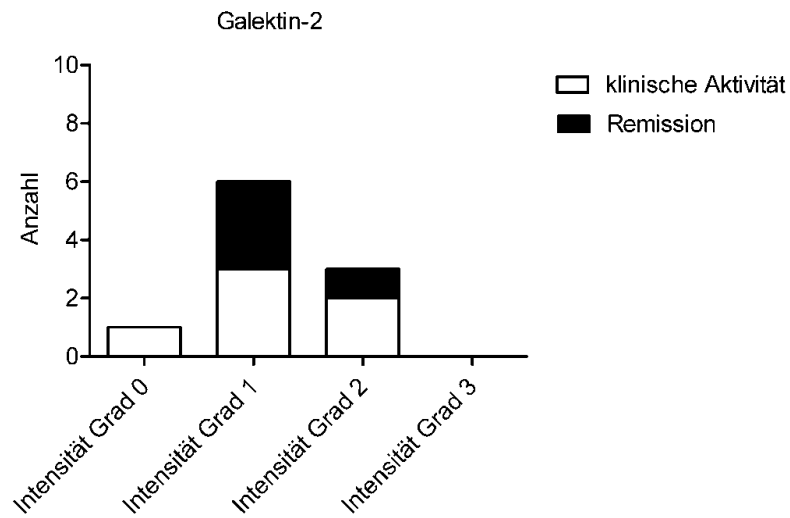


Abb. 17: Galektin-2-Expression in der Lamina epithelialis bei Patienten mit Morbus Crohn

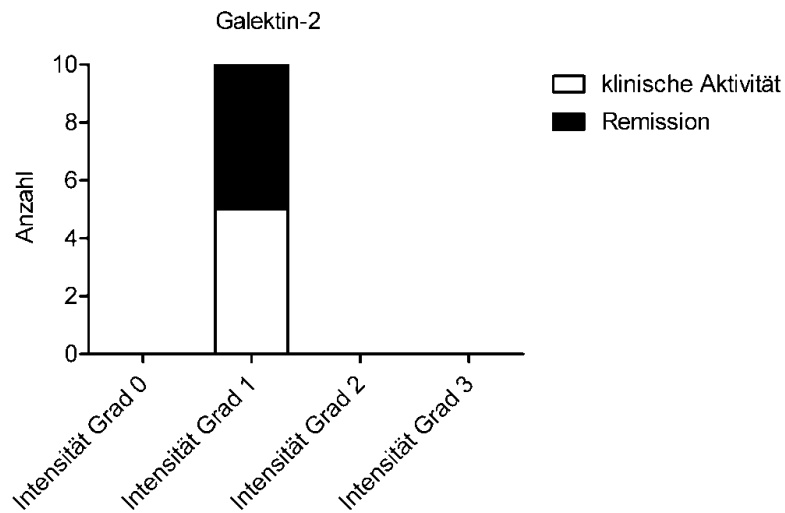


Abb. 18: Galektin-2-Expression in der Lamina epithelialis bei Patienten mit Colitis ulcerosa

In Bezug auf die epitheliale Galektin-2-Expression konnte weder bei Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa ein Unterschied zwischen der klinischen Aktivität und der Remission nachgewiesen werden (Abb. 17 und 18).

Ergebnisse

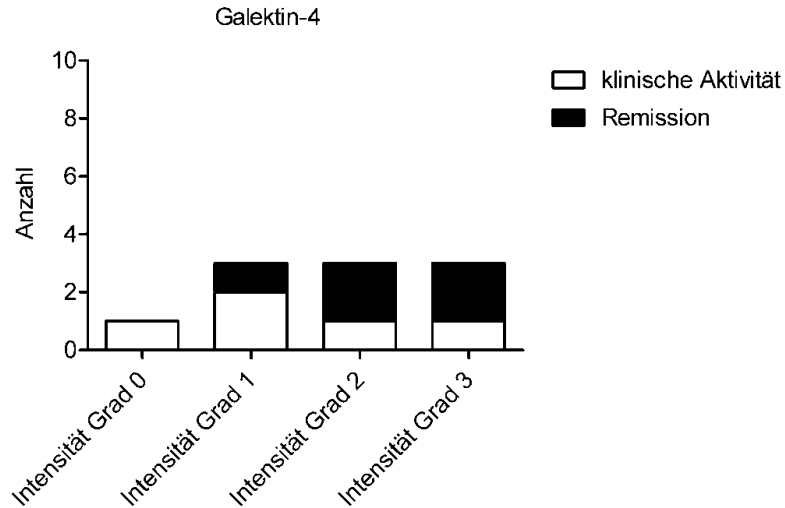


Abb. 19: Galektin-4-Expression in der Lamina epithelialis bei Patienten mit Morbus Crohn

Bei den Patienten mit Morbus Crohn zeigt sich sowohl im Zustand der klinischen Aktivität als auch in Remission keine einheitliche Expressionsstärke von Galektin-4 (Abb. 19). Bei den Patienten in Remission zeigten jeweils 10 % keine, eine mittlere und eine starke Expression. Bei 20 % wurde eine leichte Expression gefunden. Im Vergleich dazu konnte während der klinischen Aktivität jeweils in 1 von 5 Proben keine, eine mittlere und eine starke Expression und in 2 Proben eine leichte Expression detektiert werden.

Ergebnisse

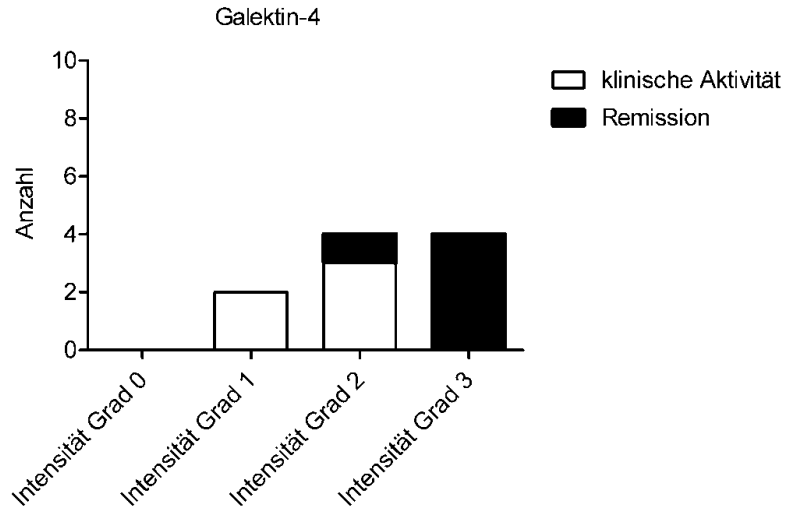


Abb. 20: Galektin-4-Expression in der Lamina epithelialis bei Patienten mit Colitis ulcerosa. Es konnte eine signifikant geringere Galektin-4-Expression während der klinischen Aktivität im Vergleich zur Remission detektiert werden ($P=0,0189$).

Bei den sich in Remission befindenden Patienten zeigt sich in 80 % der Fälle eine starke Galektin-4-Expression und in 20% der Fälle eine mittlere. Im Gegensatz dazu wurden bei den Patienten, die sich in klinischer Aktivität befanden, in 60 % eine mittlere Expression und in 40 % eine leichte Expression detektiert. Somit zeigte sich bei den Patienten mit Colitis ulcerosa eine signifikant geringere Galektin-4-Expression während der klinischen Aktivität im Vergleich zur Remission ($P=0,0189$) (Abb.20).

3.2.2 Auswertung der Galektin-exprimierenden Immunzellen in der Lamina propria

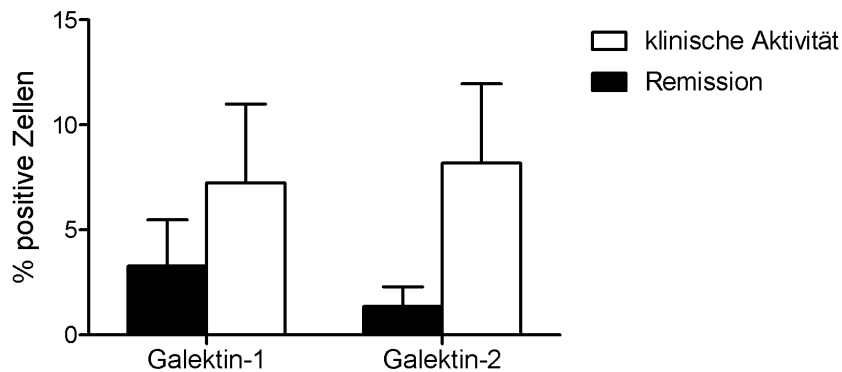


Abb. 21: Galektin-exprimierende Immunzellen in der Lamina propria. Es wurden von 20 Patienten mit CED die Galektin-exprimierenden Immunzellen in Assoziation zum klinischen Aktivitätsindex quantitativ ermittelt. Verglichen zur Remission konnte während der klinischen Aktivität ein erhöhter prozentualer Anteil Galektin-1- und -2-exprimierender Immunzellen detektiert werden. Galektin-4 wurde von den Immunzellen nicht exprimiert. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm Standardabweichung.

A) Galektin-1

Bei den Patienten mit Morbus Crohn, die sich in Remission befanden, konnten keine Galektin-1-exprimierenden Immunzellen detektiert werden. Im Vergleich zu den Patienten in klinischer Aktivität konnten sie bei 1 von 6 Patienten detektiert werden. Es waren dabei $20,8 \pm 2,4$ % der Zellen positiv.

Bei den Patienten mit Colitis ulcerosa konnten in beiden Gruppen in jeweils 2 von 5 Gewebeproben positive Immunzellen nachgewiesen werden. Während der klinischen Aktivität wurden $25,8 \pm 4,7$ % positive Zellen untersucht. In Relation dazu ist bei den in Remission befindlichen Patienten eine Reduktion der positiven Immunzellen zu verzeichnen ($16,4 \pm 1,7$ % positive Zellen).

B) Galektin-2

Bei den Patienten mit Morbus Crohn, die sich in klinischer Aktivität befanden, waren in 3 von 6 Proben Galektin-2-exprimierende Immunzellen vorhanden. Es waren dabei $19,4 \pm 11,6$ % der Zellen positiv. Im Vergleich dazu waren bei keinem Patienten in Remission positive Immunzellen zu finden.

Ergebnisse

Bei den Patienten mit Colitis ulcerosa wurde in beiden Gruppen bei 2 von 5 Patienten eine Galektin-2-Expression in Immunzellen detektiert. In der Gruppe der Patienten mit klinischer Aktivität waren $21,2 \pm 3,1$ % der Zellen positiv. Bei den sich in Remission befindenden Patienten war eine Reduktion der Galektin-2-Expression zu verzeichnen ($6,8 \pm 2,2$ % positive Zellen).

C) Galektin-4

In keiner der Patientenproben wurden Galektin-4-exprimierende Immunzellen detektiert.

3.3 Untersuchung zur intestinalen Galektin-Expression in Assoziation mit dem endoskopischen Entzündungsgrad der Mukosa

Es wurde von insgesamt 10 Patienten die intestinale Galektin-Expression in Assoziation zum endoskopischen Entzündungsgrad untersucht. Dabei hatten 5 Patienten die Diagnose eines Morbus Crohn und 5 Patienten die Diagnose einer Colitis ulcerosa. Hierfür wurden von jeweils einem Patienten eine Biopsie aus der endoskopisch entzündeten und eine aus der entzündungsfreien Mukosa verwendet. Diese wurden miteinander verglichen. Es wurden ausschließlich Proben aus dem Dickdarm verwendet, um vergleichbare Darmabschnitte zu erhalten. Mit der Methode der Immunhistochemie wurde die Proteinexpression der Galektine detektiert. Im Rahmen dieser Untersuchung sollte die Frage geklärt werden, ob der endoskopische Entzündungsgrad Einfluss auf die Galektin-Expression hat. Zunächst wurde die Expression in der Epithelzellschicht entsprechend einem semiquantitativen Intensitätsscore ausgewertet (s. 2.2.1.8). Ferner wurde der prozentuale Anteil an Galektin-exprimierenden Immunzellen in der Lamina propria bestimmt (s. 2.2.1.8).

3.3.1 Auswertung der Lamina epithelialis

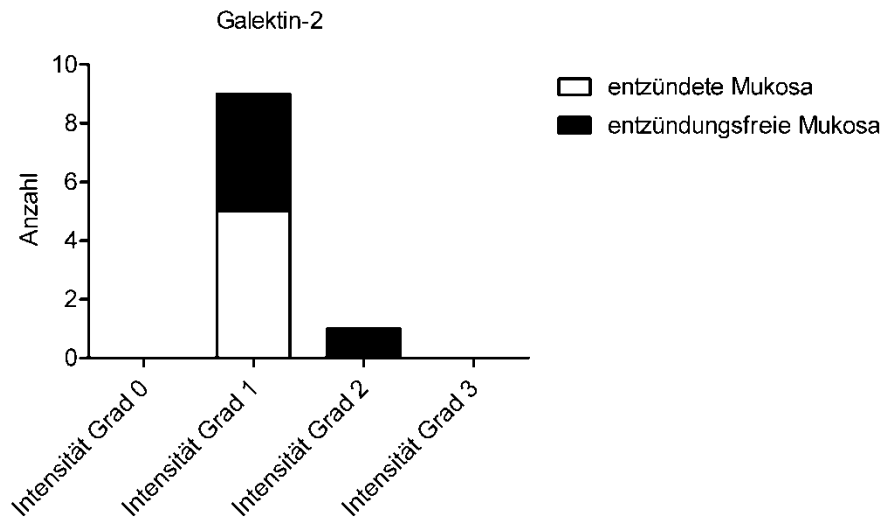


Abb. 22: Vergleich der Galektin-2-Expression in der Lamina epithelialis bei Patienten mit Morbus Crohn in Assoziation zum endoskopischen Entzündungsgrad.

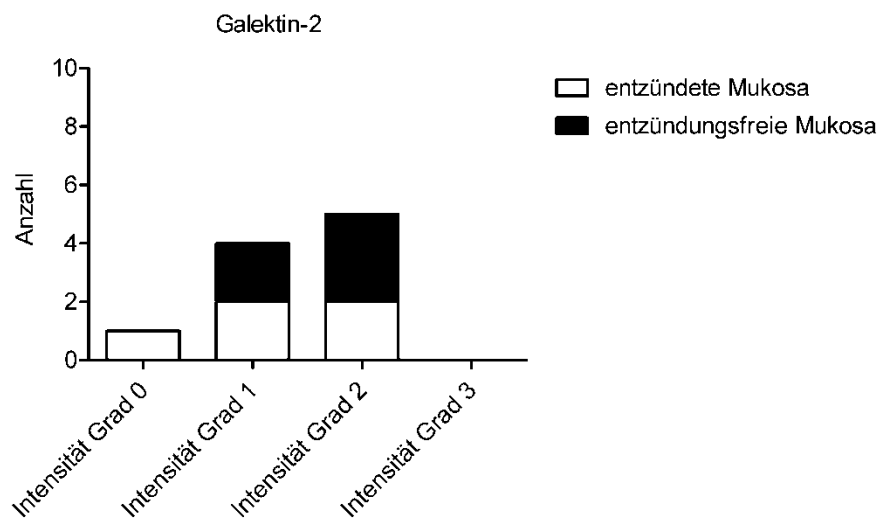


Abb. 23: Vergleich der Galektin-2-Expression in der Lamina epithelialis bei Patienten mit Colitis ulcerosa in Assoziation zum endoskopischen Entzündungsgrad.

In der entzündungsfreien Mukosa zeigten 4 von 5 Patienten mit einem Morbus Crohn eine leichte Galektin-2-Expression und ein Patient eine mittlere Expression (Abb. 22). In der entzündeten Mukosa konnte bei einem Patienten eine reduzierte Galektin-2-Expression detektiert werden. Bei 4 von 5 konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Ergebnisse

Bei den Patienten mit Colitis ulcerosa wurden in 2 von 5 Proben aus der entzündungsfreien Mukosa eine leichte Expression und bei 3 Proben eine mittlere Expression gefunden (Abb. 23). Im Vergleich zur entzündungsfreien Mukosa konnte bei zwei Patienten eine reduzierte Galektin-2-Expression in der entzündeten Mukosa detektiert werden. Dabei wurde eine Reduktion der Expression einmal von mittel auf leicht und einmal von leicht auf keine Expression gefunden.

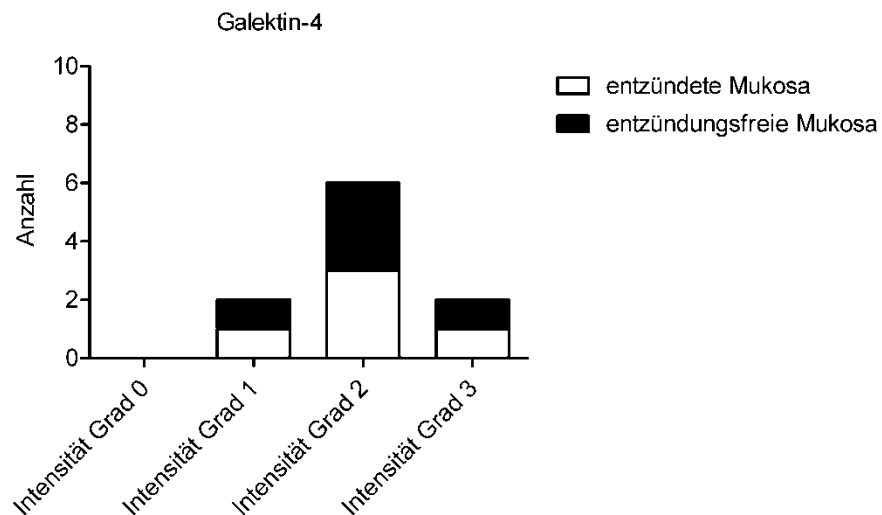


Abb. 24: Vergleich der Galektin-4-Expression in der Lamina epithelialis bei Patienten mit Morbus Crohn in Assoziation zum endoskopischen Entzündungsgrad.

Bezüglich der epithelialen Galektin-4-Expression konnte bei den Patienten mit Morbus Crohn keine Verbindung zu dem endoskopischen Entzündungsgrad gefunden werden (Abb. 24).

Ergebnisse

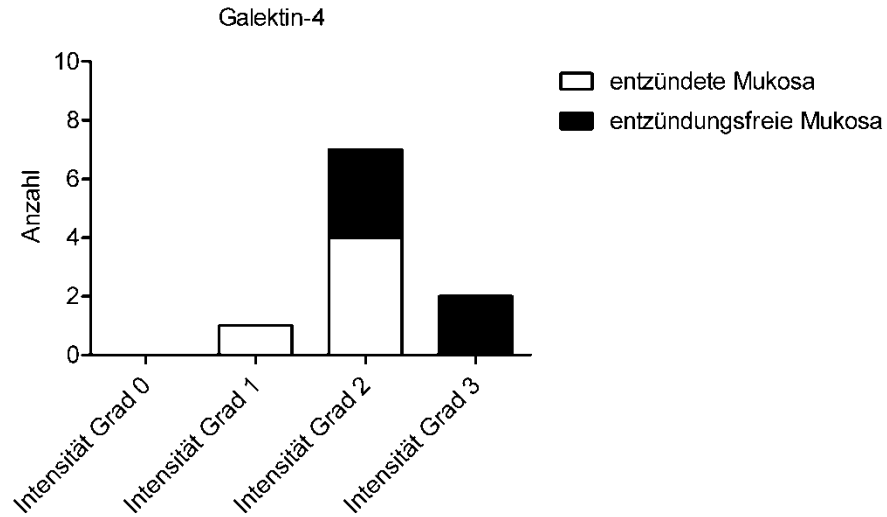


Abb. 25: Vergleich der Galektin-4-Expression in der Lamina epithelialis bei Patienten mit Colitis ulcerosa in Assoziation zum endoskopischen Entzündungsgrad.

Bei den Patienten mit Colitis ulcerosa besteht eine reduzierte Galektin-4-Expression bei 3 von 5 Patienten (60%) in den Proben aus den endoskopisch entzündeten Bereichen. Dabei konnte einmal eine Reduktion der Expression von mittel auf leicht sowie zweimal von stark auf mittel detektiert werden (Abb. 25).

3.3.2 Auswertung der Galektin-exprimierenden Immunzellen in der Lamina propria

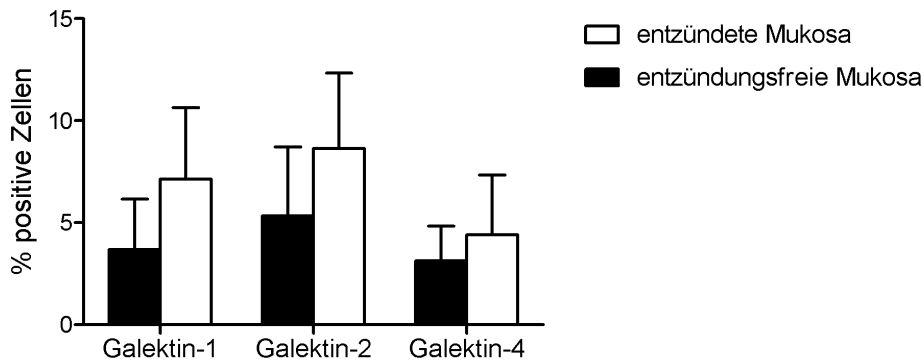


Abb. 26: Auswertung der Galektin-exprimierenden Immunzellen. Es wurden von 10 Patienten mit CED die Galektin-positiven Immunzellen in Assoziation zum endoskopischen Entzündungsgrad quantitativ ausgewertet. Es konnte ein erhöhter prozentualer Anteil Galektin-1-, -2- und -4-positiver Zellen in der endoskopisch entzündeten Mukosa detektiert werden. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm Standardabweichung.

A) Galektin-1

Im endoskopisch entzündungsfreien Bereich der Mukosa konnten bei den Patienten mit Morbus Crohn in 2 von 5 Fällen Galektin-1-exprimierende Immunzellen identifiziert werden. Dabei waren $18,5 \pm 1,2$ % der Zellen positiv. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich beim Vergleich mit der entzündeten Mukosa. Hier waren ebenfalls bei 2 von 5 Patienten positive Zellen vorhanden ($19,6 \pm 17,7$ %).

Bei den Patienten mit Colitis ulcerosa konnten in den entzündungsfreien Bereichen keine Galektin-1-exprimierenden Immunzellen detektiert werden. Im Gegensatz hierzu waren bei den entzündeten Biopsien in 2 von 5 Proben $16,2 \pm 3,2$ % der Zellen positiv.

B) Galektin-2

Im dem endoskopisch entzündungsfreien Bereich der Mukosa fanden sich bei 2 von 5 Patienten mit Morbus Crohn Galektin-2-exprimierende Immunzellen ($17,8 \pm 13,3$ %). Im Vergleich dazu wurde Galektin-2 in 4 von 5 Proben aus dem entzündeten Bereich von $12,7 \pm 4,2$ % der Zellen exprimiert.

Bei den Patienten mit Colitis ulcerosa konnten in den Biopsien aus den entzündungsfreien Bereichen keine positiven Zellen nachgewiesen werden. Im

Ergebnisse

Gegensatz hierzu waren bei den entzündeten Biopsien in einer von 5 Proben 35,7 % der Zellen positiv.

C) Galektin-4

In den endoskopisch entzündungsfreien Bereichen der Mukosa konnten bei den Patienten mit Morbus Crohn in 3 von 5 Fällen Galektin-4-exprimierende Immunzellen identifiziert werden. Dabei waren $10,4 \pm 4,1$ % der Zellen positiv. Im Vergleich zur entzündeten Mukosa wurden in einer von 5 Proben 24 % Galektin-4-exprimierende Immunzellen analysiert.

In keiner Biopsie aus dem entzündungsfreien Bereich der Mukosa konnte eine Galektin-4-Expression der Immunzellen bei den Patienten mit Colitis ulcerosa detektiert werden. Aus dem entzündeten Bereich der Mukosa wurden bei einem Patienten 20% positive Immunzellen identifiziert.

3.4 Untersuchung zur Modulation der intestinalen Galektin-Expression durch TNF- α -Antikörper

TNF- α , ein pro-inflammatorisches Zytokin, spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der CED [27]. In dieser Untersuchung soll daher analysiert werden, ob und in wie weit die Blockierung des zentralen Botenstoffes TNF- α einen Einfluss auf die Galektin-Expression hat. Hierfür wurden von insgesamt 4 Patienten jeweils eine Biopsie vor dem Beginn einer Therapie mit einem TNF- α -Antikörper (Infliximab oder Adalimumab) und eine Biopsie nach der Therapie in Bezug auf ihre Galektin-Expression analysiert. Die Gewebeentnahme erfolgte aus vergleichbaren Darmabschnitten. Dabei hatte ein Patient die Diagnose eines Morbus Crohn und 3 Patienten die Diagnose einer Colitis ulcerosa. Die Proteinexpression wurde mit der Methode der Immunhistochemie quantifiziert. Zunächst wurde die Expression in der Epithelzellschicht entsprechend einem semiquantitativen Intensitätsscore ausgewertet (s. 2.2.1.8). Ferner wurde der prozentuale Anteil an Galektin-exprimierenden Immunzellen in der Lamina propria bestimmt (s. 2.2.1.8).

3.4.1 Auswertung der Lamina epithelialis

A) Galektin-2

Es konnte kein Unterschied in der Galektin-2-Expression vor und nach der Therapie untersucht werden. Bei den Patienten wurde keine Galektin-2-Expression in der Epithelschicht detektiert.

B) Galektin-4

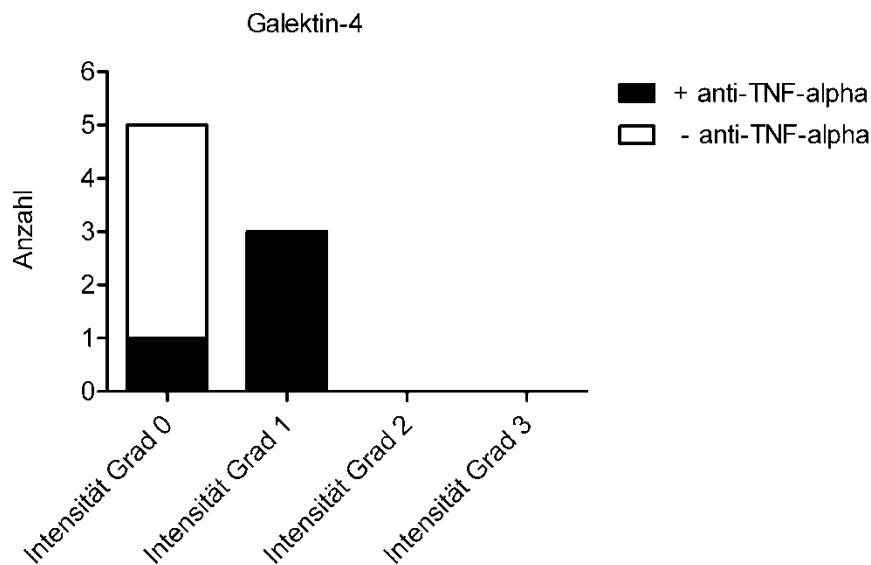


Abb. 27: Vergleich der Galektin-4-Expression in der Lamina epithelialis vor und nach der Therapie mit einem TNF- α -Antikörper. Bei 3 von 4 Patienten konnte eine erhöhte Expression nach der Therapie detektiert werden.

Bei 3 von 4 Patienten konnte eine erhöhte Expression von Galektin-4 nach der Therapie mit einem TNF- α -Antikörper ermittelt werden (Abb. 27). Dabei war vor der Therapie keine Expression zu verzeichnen, wohingegen es unter der Therapie zu einer gesteigerten Expression gekommen ist (leichte Expression). Bei einem von 4 Patienten zeigte sich kein Unterschied. Es wurde sowohl vor als auch nach der Therapie keine epitheliale Galektin-4-Expression bei diesem Patienten detektiert.

Eine Besonderheit zeigte die Färbung mit Galektin-4 in Hinsicht auf eine starke Expression der Becherzellen unter der Therapie bei einem Patienten (Abb. 28).

Ergebnisse

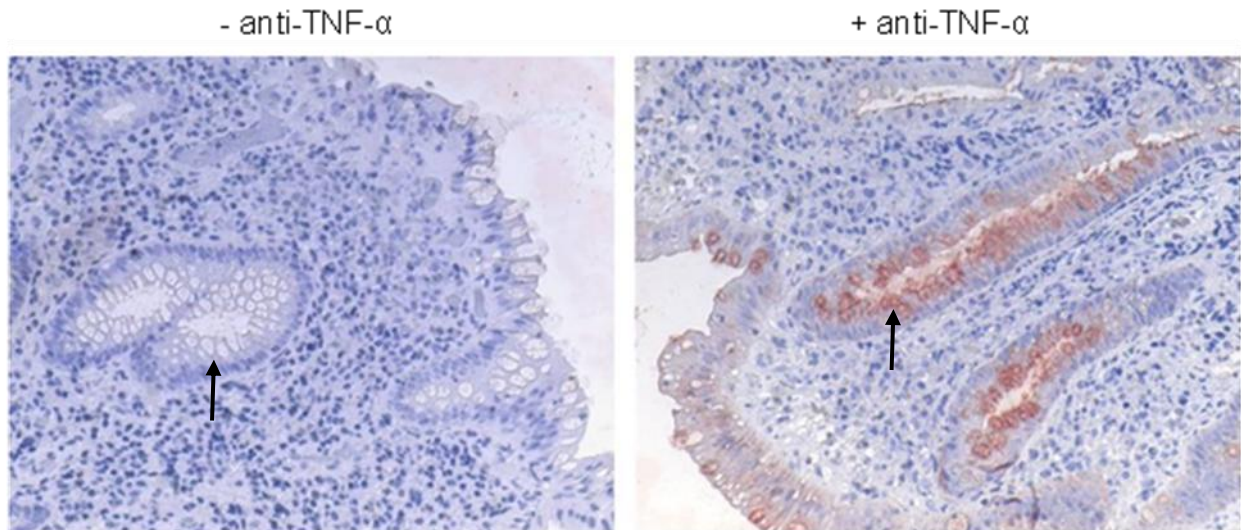


Abb. 28: Vergleich der Galektin-4-Expression vor und nach der Therapie mit einem TNF- α -Antikörper. Vor der Therapie zeigte sich keine epitheliale Expression, wohingegen nach der Therapie eine erhöhte epitheliale Expression sowie eine Galektin-4-Expression der Becherzellen detektiert werden konnte (Pfeile). Fotos wurden unter 200facher Vergrößerung aufgenommen.

3.4.2 Auswertung der Galektin-exprimierenden Immunzellen in der Lamina propria

A) Galektin-1

Bei 3 von 4 Patienten konnte eine erhöhte Anzahl an Galektin-1-exprimierenden Immunzellen nach der Therapie detektiert werden (Abb. 29 und 30). Dabei wurden vor der Therapie $4,1 \pm 5,1$ % positive Zellen untersucht. Nach der Therapie zeigte sich ein Anstieg des prozentualen Anteils an Galektin-1-exprimierenden Immunzellen auf $43,5 \pm 14,5$ %. Bei einem Patienten war kein Unterschied zu sehen. Sowohl vor als auch nach der Therapie waren keine positiven Immunzellen bei diesem Patienten vorhanden. In der folgenden Abbildung sind die drei Patienten mit dem jeweiligen prozentualen Anteil positiver Zellen dargestellt.

Ergebnisse

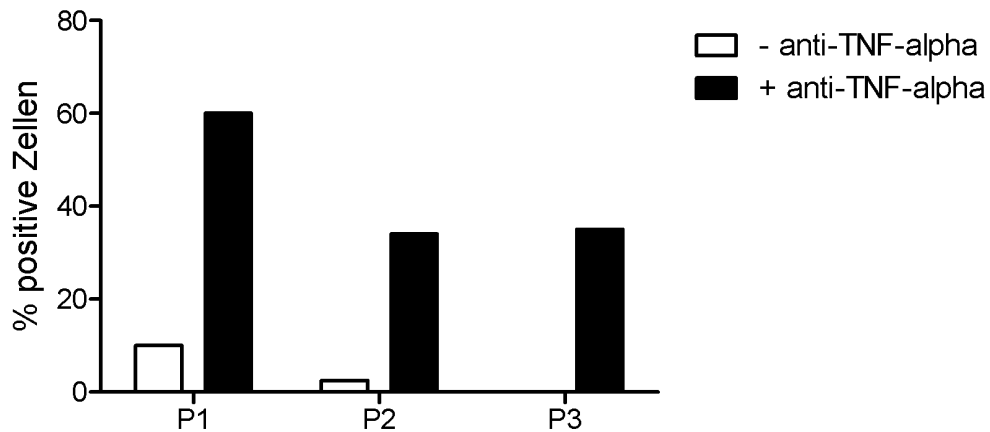


Abb. 29: Einfluss der Therapie mit einem TNF- α -Antikörper auf die Galektin-1-exprimierenden Immunzellen der Lamina propria. Die quantitative Analyse zeigt einen erhöhten prozentualen Anteil an positiven Zellen bei 3 von 4 Patienten nach der Therapie. Abkürzung: P, Patient.

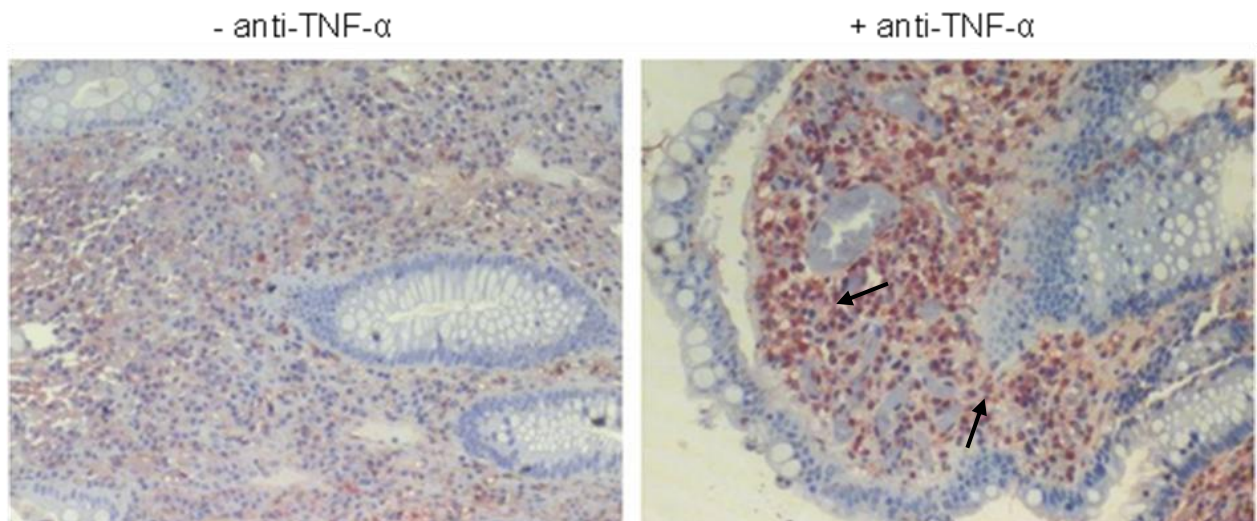


Abb. 30: Analyse der Galektin-1-exprimierenden Immunzellen in der Lamina propria vor und nach der Therapie mit einem TNF- α -Antikörper. Es wurde eine Erhöhung des prozentualen Anteils positiver Zellen nach der Therapie detektiert (Pfeile). Die Bilder sind für 3 Patienten repräsentativ (200fache Vergrößerung).

B) Galektin-2

Bei 3 von 4 Patienten konnten keine Galektin-2-exprimierenden Immunzellen detektiert werden. Bei einem Patienten waren vor der Therapie keine positiven Immunzellen vorhanden, wohingegen unter der Therapie 10 % positive Zellen zu verzeichnen waren.

Ergebnisse

C) Galektin-4

Es konnten keine Galektin-4-exprimierenden Immunzellen detektiert werden.

3.5 Analyse der intestinalen Galektin-Expression mittels Western Blot

Ergänzend zur Immunhistochemie wurde mittels Western Blot die intestinale Galektin-Expression untersucht. Hierfür wurden die epithelialen Zelllinien HT-29 und Caco-2 verwendet. Es handelt sich dabei um kultivierte, adhärente Zelllinien eines kolorektalen Adenokarzinoms.

A) Galektin-1

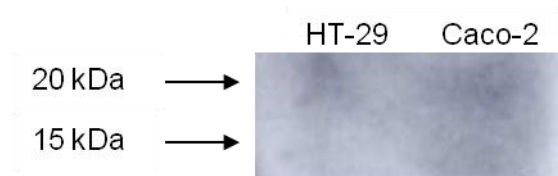


Abb. 31: Western Blot-Analyse zur Expression von Galektin-1

Die Expression von Galektin-1 konnte in keinem der Zell-Lysate detektiert werden. Dies bestätigt die immunhistologischen Untersuchungen, bei denen ebenfalls keine Expression im Epithel detektiert worden war.

B) Galektin-2

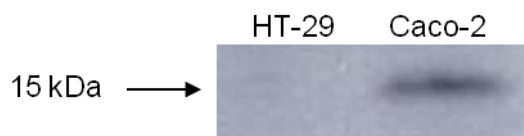


Abb. 32: Western Blot-Analyse zur Expression von Galektin-2

In den Caco-2-Zell-Lysaten konnte eine Galektin-2-Proteinbande bei ca. 15 kDa nachgewiesen werden. Dagegen wiesen die Lysate der HT-29-Zellen keine detektierbare Galektin-2-Bande auf.

Ergebnisse

C) Galektin-4

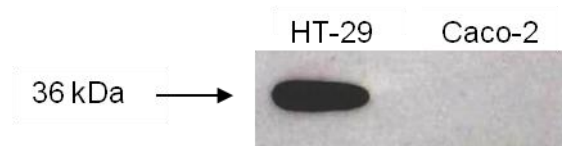


Abb. 33: Western Blot-Analyse zur Expression von Galektin-4

In den HT-29-Zell-Lysaten konnte Galektin-4 durch eine spezifische Bande bei 36 kDa detektiert werden. Caco-2-Zellen exprimieren kein Galektin-4.

4 DISKUSSION

CED sind charakterisiert durch zwei verschiedene Formen der intestinalen Entzündung, dem Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa. Merkmale dieser Erkrankungen sind chronisch-rezidivierende entzündliche Veränderungen der Dick- und Dünndarmschleimhaut. Die Pathogenese der CED ist bis heute noch ungeklärt, gesichert ist jedoch ihre multifaktorielle Entstehung. Ein entscheidender Faktor stellt dabei die Dysregulation der intestinalen Immunantwort auf Pathogene dar. Während der Initiierung und dem Verlauf der CED kommt es zu einer Aktivierung und Proliferation von T-Zellen in der Lamina propria sowie zu einer Resistenz dieser Zellen gegenüber pro-apoptotischen Signalen [22]. Es kommt zu einer Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , die zu einer Aufrechterhaltung der intestinalen Entzündung beitragen [27]. Galektine beeinflussen auf vielfältige Weise immunologische Prozesse. Dabei handelt es sich um zuckerbindende Lektine. Sie sind wichtige Regulatoren der Immun- und Entzündungsantwort sowie der Homöostase des Immunsystems [32]. In verschiedenen *in vivo* Untersuchungen konnte das anti-inflammatorische Potential von Galektin-1, -2 und -4 auf die intestinale Entzündung belegt werden, was die Möglichkeit einer Therapie der CED durch Galektine aufzeigt [37, 46, 48]. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Galektine die Apoptose von T-Zellen induziert und somit die akute und chronische Colitis im Maus-Modell verbessert. Neben der Eindämmung der abnormalen T-Zell-vermittelten Immunreaktion spielt zudem die Wiederherstellung der intestinalen Barriereintegrität eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von CED. Dabei konnte gezeigt werden, dass Galektin-2 und Galektin-4 *in vitro* die Epithelrestitution durch Initiierung der Migration und Zellzyklusaktivierung fördern können und damit eine wichtige Funktion bei Wundheilungsprozessen einnehmen [52]. Die immunmodulierende Wirkung und der positive Effekt auf die Epithelrestitution durch diese Galektine eröffnen eine neue therapeutische Option in der Behandlung von CED.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Expression von Galektin-1, -2 und -4 im GIT von chronisch entzündlich Darmerkrankten. Dabei wurde die Expression von Patienten mit CED mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen und in Assoziation mit dem klinischen Aktivitätsindex, dem endoskopischen Entzündungsgrad und der Therapie mit einem TNF- α -Antikörper analysiert. Um die Expression auf proteinbiochemischer Ebene zu detektieren wurde die Methode der Immunhistochemie

Diskussion

verwendet. Hierfür wurden Biopsien aus dem Dickdarm von Patienten mit CED verwendet.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass Galektin-1 nicht von Epithelzellen im Darm exprimiert wird. Im Gegensatz hierzu konnte eine Expression von Galektin-1 im Bindegewebe, in Muskelzellen, aber auch in Immunzellen der Lamina propria detektiert werden. Durch die Ergebnisse des Western Blots konnte diese Untersuchung bestätigt werden. In zwei verschiedenen Epithelzelllinien, den HT-29- und Caco-2-Zellen, konnte ebenfalls keine Galektin-1-Expression untersucht werden. Dieses Expressionsmuster deckt sich mit Vorarbeiten an einem Mausmodell aus unserem Labor [48]. Dennoch scheint die Expression von Galektin-1 in Mäusen zu variieren. Eine Arbeit über die Galektin-1-Expression in verschiedenen Colitis-Mausmodellen zeigt, dass die Expression je nach Colitis-Mausmodell und genetischem Hintergrund der Mäuse unterschiedlich ausfallen kann [59].

Galaktin-2 und -4 wurden im Gegensatz zu Galektin-1 vor allem in der Epithelschicht exprimiert. Durch andere Arbeiten kann dieses Expressionsprofil bestätigt werden [60]. Die vorliegende Arbeit bekräftigt die bemerkenswerte Lokalisation dieser Galektine im Zytoplasma der Epithelien, was die Hypothese unterstützt, dass Galektin-2 und -4 auch intrazelluläre Liganden besitzen über die sie Signaltransduktionswege induzieren und somit Funktionen in intestinalen Epithelzellen besitzen.

Gegenstand dieser Arbeit war der Vergleich der epithelialen Expression von Galektin-2 und -4 von Patienten mit CED mit einer gesunden Kontrollgruppe. Dabei sollte in diesem ersten Schritt die Frage untersucht werden, ob sich die Galektin-Expression in der Entzündung verglichen zum gesunden Dickdarm unterscheidet. In der Gruppe der CED ergab die Analyse der Galektin-2 und -4-Expression verglichen zur Kontrolle ein breites Spektrum an epithelialen Expressionsstärken. Vorherige Untersuchungen in einem Modell der akuten DSS-induzierten Colitis zeigten eine reduzierte Galektin-2-Expression in der Entzündung, die unter der Behandlung der Mäuse mit Tacrolimus angehoben werden konnte [48]. Ferner zeigt eine andere Studie, dass eine erniedrigte Galektin-4-Expression in der Epithelschicht der kranken Mäusen im Vergleich zu den Gesunden untersucht werden konnte [59]. Dies ließ sich in Patienten mit CED nicht eindeutig bestätigen. Die Regulation der Galektin-Expression scheint im Menschen weitaus komplexer zu sein als im Tiermodell.

Diskussion

Zudem wurden bei dem Vergleich von Patienten mit CED mit der Kontrollgruppe Galektin-1- und -2-exprimierende Immunzellen in der Lamina propria der Patientenproben detektiert. Diese waren in der Kontrollgruppe nicht zu finden. Dies legt nahe, dass die Galektin-Expression während der Entzündung durch eine Veränderung in der Aktivität der Immunzellen ausgelöst wird [32]. Aufgrund der Tatsache, dass die intrazellulären Funktionen dieser Galektine noch weitgehend unerforscht sind, stellt sich daher die Frage, inwieweit die Expression von Galektin-1 und -2 in den Immunzellen zu der Regulation der Entzündungs- und Immunantwort im Rahmen der CED beiträgt und ob auch über die intrazelluläre Expression dieser Galektine die Entzündungsantwort reduziert wird. Bisherige Studien liefern erste Hinweise auf die intrazelluläre Rolle von Galektin-1. Eine Untersuchung konnte zeigen, dass Galektin-1 in CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen stark exprimiert wird und essentiell für die immunsuppressive Aktivität dieser Zellen verantwortlich ist [61]. Bei Betrachtung der eigenen Ergebnisse und unter Einbezug der aktuellen Studienlage kann daher angenommen werden, dass die Galektin-Expression in Immunzellen aufgrund des anti-inflammatorischen Potentials von Galektin-1 und -2 eine Gegenregulation gegen die überschießende Immunantwort darstellt. Durch die Veränderung in der Aktivität der Immunzellen werden Galektin-1 und -2 exprimiert, um der Entzündung entgegenzuwirken. Die vorgestellte Hypothese würde die erhöhte Anzahl Galektin-positiver Zellen in der Lamina propria aus Proben von Patienten mit CED erklären. Diese Hypothese könnte in weiterführenden Studien geklärt werden.

Gegenstand dieser Arbeit war zudem die Untersuchung der epithelialen Expression von Galektin-2 und -4 in Assoziation mit dem klinischen Aktivitätsindex. Es konnte erstmals eine Reduktion der Galektin-4-Expression in der Epithelschicht bei den Patienten mit Colitis ulcerosa, die sich in klinischer Aktivität befanden, im Vergleich zu denen in Remission festgestellt werden. Interessanterweise zeigte sich kein Unterschied bei der Galektin-2-Expression. Dies unterstreicht die Tatsache, dass Galektin-2, als Proto-Typ Galektin und Galektin-4, ein Tandem-Repeat Galektin, strukturell verschiedenen Galektingruppen angehören und durch ihre Struktur auch Unterschiede in ihrer Expression und Modulation der Entzündungs- und Immunantwort aufweisen können. Neben der unkontrollierten Immunantwort, die unter anderem durch T-Zell-Stimulierung und Zytokinproduktion vorangetrieben wird, ist eine Funktionsstörung der T-Zell-Apoptose ein zentraler Mechanismus bei der Initiierung und dem Verlauf der CED [62].

Diskussion

In vivo Untersuchungen zeigen, dass Galektin-4 von Epithelzellen exprimiert und sezerniert wird sowie die Apoptose von aktivierten Lamina propria T-Zellen induziert [37]. Die reduzierte epitheliale Galektin-4-Expression bei den Patienten während der klinischen Aktivität könnte somit eine Erklärung für die uneingeschränkte Apoptose der T-Zellen, die bei CED beobachtet wird, sein. Diese Beobachtung untermauert die Hypothese, dass Galektin-4 eine entscheidende Rolle im Darm spielt und die intestinale Entzündung verbessern kann. Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Pathogenese der CED ist die durch die chronische Entzündung entstandene Zerstörung der Epithelzellschicht und somit ihrer Barrierefunktion. Es konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass Galektin-4 *in vitro* die Epithelzellrestitution durch Initiierung der Migration und Zellzyklusaktivierung fördert und damit eine wichtige Funktion bei Wundheilungsprozessen einnimmt [52]. Die verminderte Galektin-4-Expression bei den Patienten während der klinischen Aktivität könnte somit dazu beitragen, dass die zerstörte Epithelzellschicht schlechter wieder hergestellt wird und die Patienten vermehrt unter klinischen Symptomen, wie z.B. Blut im Stuhl und abdominellen Schmerzen, leiden. Galektin-4 ist in der Lage durch Induktion der Apoptose von T-Lymphozyten und Reduktion der TNF- α -Sekretion natürlich vorkommende anti-inflammatorische Systeme wiederherstellen und eine wichtige Funktion in der Wundheilung einzunehmen. Dadurch stellt es ein therapeutisches Agens in der Therapie der CED dar, da es durch die Wiederherstellung biologischer Zellfunktionen in der Lage ist, die Homöostase des Immunsystems zu regulieren.

Interessanterweise konnte eine reduzierte Galektin-4-Expression während der klinischen Aktivität bei den Patienten mit Morbus Crohn nicht gefunden werden. Die Unterschiede in den Galektinexpressionsmustern zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zeigen, dass es sich zwar bei beiden Erkrankungen um chronische Entzündungen der Dün- und Dickdarmschleimhaut handelt, es aber dennoch eindeutige Unterschiede auf proteinbiochemischer sowie genregulatorischer Ebene gibt, die weitergehend untersucht werden müssen.

Ferner wurde in dieser Arbeit die epitheliale Galektin-Expression von Patienten mit CED in Assoziation mit dem endoskopischen Entzündungsgrad untersucht. Der Vergleich zeigt, dass in der entzündeten Mukosa bei mehr als der Hälfte der untersuchten Patienten mit Colitis ulcerosa es zu einer reduzierten Galektin-4-Expression gekommen ist. Diese Tatsache unterstreicht die Hypothese, dass eine reduzierte Galektin-4-

Diskussion

Expression möglicherweise in Verbindung zur intestinalen Entzündung steht, indem sie zur uneingeschränkten Apoptose der T-Zellen beiträgt. Eine Substitution von Galektin-4 stellt somit eine mögliche Therapieoption der CED dar. Interessanterweise konnte dieser Effekt nicht bei den Patienten mit einem Morbus Crohn untersucht werden. Hier zeigte sich kein Unterschied in der Galektin-4-Expression in Assoziation zum endoskopischen Entzündungsgrad. Dieses Ergebnis bestätigt die Tatsache, dass der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa zwar beide durch die chronischen rezidivierenden Entzündungen der Mukosa charakterisiert sind, es sich aber dennoch um zwei unterschiedliche Krankheitsentitäten handelt.

TNF- α ist ein pro-inflammatorisches Zytokin des Immunsystems, welches an lokalen und systemischen Entzündungen beteiligt ist [28]. Dabei trägt es durch verschiedene Mechanismen wie der verstärkten Transkription pro-inflammatorischer Gene zur Verstärkung der mukosalen Entzündung bei CED bei [28]. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die gezielte Blockierung von TNF- α eine effektive Therapie in der Behandlung der CED darstellt [63]. Gegenstand dieser Arbeit war daher der Vergleich der Galektin-Expression vor und nach der Therapie mit einem TNF- α -Antikörper. Hierfür wurden von jeweils einem Patienten eine Biopsie vor und eine nach der Therapie verwendet. Unsere Untersuchung konnte dabei zeigen, dass eine erhöhte epitheliale Expression von Galektin-4 bei mehr als der Hälfte der Patienten nach der Therapie detektiert wurde. Dabei war vor der Therapie keine Expression zu verzeichnen, wohingegen unter der Therapie es zu einem Anstieg der Expression gekommen ist. Die Ergebnisse zeigen, dass die Galektin-4-Expression bei den Patienten mit CED vor der Therapie stark reduziert und nicht nachweisbar war. Durch eine effiziente anti-inflammatorische Behandlung mit einem TNF- α -Antikörper konnte sie jedoch wieder angehoben werden. Die reduzierte Galektin-4-Expression während der intestinalen Entzündung könnte zu der erniedrigten Apoptoserate, die in der Pathogenese der CED zu verzeichnen ist, beitragen. Unter der Therapie mit einem anti-TNF- α -Antikörper, der die Apoptose aktivierter Lymphozyten induziert und die Lymphozytenmigration inhibiert, konnte auch eine erhöhte Galektin-4-Expression der Epithelzellen untersucht werden. Insgesamt ist festzuhalten, dass das Expressionsniveau von Galektin-4 für den Vergleich vor und nach der Therapie mit einem TNF- α -Antikörper niedrig war. Bei allen Patienten konnte entweder keine oder nur eine leichte Expression detektiert werden. Für diesen Versuch wurden Paraffinschnitte verwendet. Im Gegensatz dazu zeigte sich

Diskussion

bei den Gefrierschnitten eine insgesamt höhere Galektin-4-Expression. Dies könnte man damit erklären, dass der Antikörper entsprechend der verwendeten Fixierung der Proben eine unterschiedlich starke Affinität zu seinem Antigen aufweist.

Eine Besonderheit zeigte die immunhistochemische Färbung mit Galektin-4 in Hinsicht auf eine starke Expression der Becherzellen nach der Therapie mit einem TNF- α -Antikörper bei einem Patienten. Die spezifische Lokalisation von Galektin-4 im Zytoplasma der Becherzellen deutet auf eine spezielle Rolle von Galektin-4 in den Schleim-produzierenden Zellen hin. Weitere Studien könnten diesen Zusammenhang untersuchen.

Ferner zeigte sich bei dem Vergleich vor und nach der Therapie mit einem TNF- α -Antikörper eine erhöhte Anzahl an Galektin-1-exprimierenden Immunzellen in der Lamina propria nach der Therapie. TNF- α als pro-inflammatorisches Zytokin spielt eine entscheidende Rolle in der intestinalen Immunantwort. Mehrere Studien zeigten, dass nach der Initiierung und im Verlauf der CED es zu einer erhöhten Produktion an pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 und IL-12) und einer Reduktion an anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-4 und -10 kommt [49]. TNF- α konnte in den letzten Jahren als ein therapeutisches Ziel in der Behandlung der aktiven, therapie-refraktären CED eingesetzt werden und die gezielte Blockade dieses Zytokins durch Antikörper zeigte eine Verbesserung der klinischen Beschwerden der Patienten [49]. TNF- α trägt möglicherweise über einen bisher noch unbekanntem Regulationsmechanismus dazu bei, dass Galektin-1 in den Immunzellen der Lamina propria reduziert ist. In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen konnte das anti-inflammatorische Potential von Galektin-1 belegt. In Mausmodellen der chronischen Entzündung und Autoimmunität konnte unter der rekombinanten Gabe von Galektin-1 eine Reduktion der klinischen und histopathologischen Merkmale einer Entzündung detektiert werden. Dennoch sind die intrazellulären Funktionen von Galektin-1 bisher weitgehend unerforscht. Somit bleibt die Frage offen, ob Galektin-1 auch im intrazellulären Kompartiment der Immunzellen eine anti-inflammatorische Rolle auf die intestinale Entzündung einnimmt und z.B. die Apoptose aktivierter T-Zellen induziert.

Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse konnten die Hypothese, dass Galektine eine zentrale und wichtige Rolle in verschiedenen immunologischen Systemen einnehmen, bestätigen. Galektine und ihr verändertes Expressionsprofil bei CED stellen dabei einen von vielen Erklärungsansätzen für die gestörte Homöostase des intestinalen

Diskussion

Immunsystems dar. Es konnten unterstützende Hinweise aufgezeigt werden, dass Galektine das anti-inflammatorische Potential in der Therapie der CED besitzen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Unter chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) versteht man zwei verschiedene Formen der intestinalen Entzündung, den Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa. Merkmale dieser Erkrankungen sind chronisch-rezidivierende entzündliche Veränderungen der Dick- und Dünndarmschleimhaut, die die Patienten in ihrem Leben nachhaltig beeinflussen. Die Ätiopathogenese ist bis heute ungeklärt, gesichert ist jedoch eine multifaktorielle Entstehung. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Dysregulation des intestinalen Immunsystems. Es kommt im Rahmen der Initiierung und dem Verlauf der CED zu einer überschießenden Immunantwort und einer gestörten T-Zellapoptose. Dies führt zur Anreicherung von aktivierten T-Zellen in der Lamina propria der Mukosa. Die Folge der Entzündung ist eine Zerstörung der Epithelzellschicht und somit ihrer Barrierefunktion. Galektine wurden in den letzten Jahren zunehmend als Regulatoren der Immun- und Entzündungsantwort charakterisiert. Es handelt sich um zuckerbindende Lektine, die auf vielfältige Art Prozesse, wie z.B. Zellaktivierung, Proliferation, Zytokinsekretion und Apoptose, beeinflussen. In *in vivo* Untersuchungen wurde bereits das anti-inflammatorische und dadurch therapeutische Potential von Galektin -1, -2 und -4 auf die akute und chronische Entzündung in einem Colitis-Mausmodell belegt. Obwohl es unumstritten ist, dass diese Galektine *in vivo* die intestinale Entzündung verbessern und somit eine potentielle Therapie bei CED darstellen, bleibt die Expression dieser Galektine bei Patienten mit CED bisher unerforscht.

Ziel dieser Arbeit war, die Expression der Galektine -1, -2 und -4 mit der Methode der Immunhistochemie in Proben aus humanem Dickdarm von Patienten mit CED in Bezug auf eine gesunde Kontrollgruppe, den klinischen Aktivitätsindex, den endoskopischen Entzündungsgrad und die Therapie mit einem TNF- α -Antikörper zu analysieren.

Unsere Arbeit zeigt, dass Galektin-1 nicht von Epithelzellen im Darm exprimiert wird. Dagegen konnte eine Expression von Galektin-1 hauptsächlich im Bindegewebe, in Muskelzellen, aber auch in Immunzellen der Lamina propria detektiert werden. Galektin-2 und -4 zeigten im Gegensatz hierzu ein vorwiegend epitheliales Expressionsmuster.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass bei den Patienten mit CED verglichen zu einer gesunden Kontrollgruppe keine einheitliche epitheliale Expressionsstärke von Galektin-2 und -4 untersucht wurde. Ferner konnten bei dieser Untersuchung Galektin-1 und -2-exprimierende Immunzellen in der Lamina propria bei den Patienten mit Morbus

Zusammenfassung

Crohn oder Colitis ulcerosa detektiert werden. Diese waren in der Kontrollgruppe nicht zu finden. Unsere Untersuchung legt somit nahe, dass die Galektin-Expression während der Entzündung durch eine Veränderung in der Aktivität der Immunzellen ausgelöst wird.

Die vorliegende Arbeit konnte erstmals zeigen, dass bei den Patienten mit einer Colitis ulcerosa während der klinischen Aktivität eine reduzierte epitheliale Galektin-4-Expression im Vergleich zur Remission detektiert werden konnte. In Bezug auf die Galektin-2-Expression konnte dies nicht untersucht werden.

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Galektin-Expression der chronisch entzündlich Darmerkrankten in Assoziation mit dem endoskopischen Entzündungsgrad. Der Vergleich zeigt, dass bei mehr als der Hälfte der Patienten mit Colitis ulcerosa eine reduzierte epitheliale Galektin-4-Expression in der entzündeten Mukosa detektiert werden konnte.

Gegenstand dieser Arbeit war zudem der Vergleich der Expressionen vor und nach der Therapie mit einem TNF- α -Antikörper. Unsere Untersuchung konnte dabei zeigen, dass eine erhöhte epitheliale Expression von Galektin-4 bei mehr als der Hälfte der Patienten nach der Therapie detektiert wurde. Dabei war vor der Therapie keine Expression zu verzeichnen, wohingegen unter der Therapie es zu einem Anstieg der Expression gekommen ist. Ferner zeigte sich bei dieser Untersuchung eine erhöhte Anzahl an Galektin-1-exprimierenden Zellen in der Lamina propria nach der Therapie.

Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse konnten die Hypothese, dass Galektine und ihr verändertes Expressionsprofil bei CED einen von vielen Erklärungsansätzen für die gestörte Homöostase des intestinalen Immunsystems darstellen, bestätigen. Die reduzierte epitheliale Galektin-4-Expression im Rahmen der verschiedenen Untersuchungen unterstützt die Hypothese, dass Galektin-4 eine entscheidende Rolle in der Modulation der intestinalen Entzündung spielt. In *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass Galektin-4 von Epithelzellen exprimiert und sezerniert wird sowie die Apoptose von aktivierten T-Zellen induziert und dadurch die Colitis in Mausmodellen verbessert. Die reduzierte epitheliale Galektin-4-Expression könnte die verminderte Apoptose von T-Zellen, wie sie bei CED beobachtet wird, erklären und somit Galektin-4 als mögliche therapeutische Option in der Behandlung der CED identifizieren.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Duchmann R, Hoffmann J, Marth T, Schneider T, Stallmach A, Zeitz M: Mukosales Immunsystem im Darm - Immunologische Grundlagen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen und der HIV-induzierten Enteropathie. *magazin forschung* 1999, 1.
2. Lüllmann-Rauch R: Histologie. Stuttgart: Thieme; 2003.
3. Mowat AM: Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Immunology* 2003, 3:331-341.
4. Dignass AU: Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. *InflammBowelDis* 2001, 7: 68-77.
5. Wittig BM, Zeitz M: The gut as an organ of immunology. *Int J Colorectal Dis* 2003, 18:181-187.
6. Garside P, Mowat AM: Oral tolerance. *Semin Immunol* 2001, 13:177-185.
7. Barbosa T, Rescigno M: Host-bacteria interactions in the intestine: homeostasis to chronic inflammation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2010, 2:80-97.
8. Dignass AU: Biologische Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Bremen: UNI-MED; 2003.
9. Wehkamp J, Stange E: Is There a Role for Defensins in IBD? *Pathophysiology* 2008, 14:85-87.
10. Kohlgraf KG, Pingel LC, Dietrich DE, Brogden KA: Defensins as anti-inflammatory compounds and mucosal adjuvants. *Future Microbiol* 2010, 5:99-113.

Literaturverzeichnis

11. Mackay IR, Rosen FS: The Immune System - First of Two Parts. *N Engl J Med* 2000, 343:37-49.
12. Salim SY, Söderholm JD: Importance of Disrupted Intestinal Barrier in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2010.
13. Renz-Polster H, Krautzig S: Basislehrbuch Innere Medizin. München: Elsevier 2008.
14. Baumgart D, Carding S: Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007, 369:1627-1640.
15. Kucharzik T, Maaser C, Luger A, Kagnoff M, Mayer L, Targan S, Domschke W: Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12:1068-1083.
16. Ekbohm A, Helmick C, Zack M, Adami H: The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, populationbased study in Sweden. *Gastroenterology* 1991, 100:350-358.
17. Fiocchi C: Inflammatory bowel disease: genetics and much more. *Curr Opin Gastroenterol* 2002, 18(4):408-409.
18. Binder V: Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 1998, 16:351-355.
19. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH *et al*: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001, 411:603-606.
20. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M *et al*: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001., 411:599-603.

Literaturverzeichnis

21. Neurath MF, Finotto S, Fuss I, Boivirant M, Galle PR, Stober W: Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *TRENDS in Immunology* 2001, 22:21-26.
22. Fiocchi C: Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998, 115:182-205.
23. Sellon R, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman L, Grenther W, Balish E, Rennick D, Sartor R: Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 1998, 66:5224–5231.
24. Stange EF: Glucocorticoid receptor activity in inflammatory bowel disease: hindsight or foresight? *Eur J Clin Invest* 1999, 29(4):278-279.
25. Mouser JF, Hyams JS: Infliximab: a novel chimeric monoclonal antibody for the treatment of Crohn's disease. *Clin Ther* 1999, 21(6):932-942; discussion 931.
26. van Balkom BP, Schoon EJ, Stockbrugger RW, Wolters FL, van Hogezaand RA, van Deventer SJ, Oldenburg B, van Dullemen HM, Russel MG: Effects of anti-tumour necrosis factor-alpha therapy on the quality of life in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002, 16(6):1101-1107.
27. Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK: Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* 2008, 14:4280-4288.
28. Bosani M, Ardizzone S, Porro GB: Biologic targeting in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Biologics: Targets and Therapy* 2009:77-97.
29. Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S: Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004, 126:1593-1610.

Literaturverzeichnis

30. Liu F-T: Galectins: novel anti-inflammatory drug targets. *Expert Opin Ther Targets* 2002, 6:461-468.
31. Hirabayashi J, Kasai K: The family of metazoan metal-independent β -galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology* 1993, 3:297-304.
32. Liu FT, Rabinovich GA: Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2010, 1183:158-182.
33. Rabinovich GA, Toscana MA: Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature* 2009, 9:338-352.
34. Cooper D, Barondes S: God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology* 1999, 9:979-984.
35. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S: Galectins and their ligands: Amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol* 2002, 23:313–320.
36. Sturm A, Lensch M, Andre S, Kaltner H, Wiedenmann B, Rosewicz S, Dignass A, Gabius H: Human galectin-2: novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation. *J Immunol* 2004, 173:3825-3837.
37. Paclik D, Danese S, Berndt U, Wiedenmann B, Dignass A, Sturm A: Galectin-4 Controls Intestinal Inflammation by Selective Regulation of Peripheral and Mucosal T Cell Apoptosis and Cell Cycle. *PLoS ONE* 2008, 7:e2629.
38. Liu FT, Patterson R, Wang J: Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1572:263-273.
39. Illarregui J, Bianco G, Toscano M, Rabinovich G: The coming of age of galectins as immunomodulatory agents: impact of these carbohydrate binding proteins in T

Literaturverzeichnis

- cell physiology and chronic inflammatory disorders. *Ann Rheum Dis* 2005, 64:96-103.
40. Huflejt ME, Leffler H: Galectin-4 in normal tissues and cancer. *Glycoconj J* 2004, 20(4):247-255.
 41. Levi G, Teichberg VI: Isolation and physicochemical characterization of electrolectin, a beta-D-galactoside binding lectin from the lectric organ of *Electrophorus electricus*. *J Biol Chem* 1981, 256:5735–5740.
 42. Stowell S, Qian Y, Karmakar S, Koyama N, Dias-Baruffi M, Leffler H, McEver R, Cummings R: Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *J Immunol* 2008, 5:3091-3102.
 43. Rabinovich G, Ariel A, HersHKoviz R, Hirabayashi J, Kasai K, Lider O: Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology* 1999, 97:100-106.
 44. He J, Baum L: Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration. *Lab Invest* 2006, 86:578-590.
 45. Rabinovich G, Liu F, Hirashima M, Anderson A: An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scand J Immunol* 2007, 66:143-158.
 46. Santucci L, Fiorucci S, Rubenstein N, Mencalli A, Palazetti B, Federici B, Rabinovich G, Morelli A: Galectin-1 supresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 2003, 124:1381-1394.
 47. Huflejt ME, Leffler H: Galectin-4 in normal tissues and cancer. *Glycoconj J* 2004, 20(4):247-255.

Literaturverzeichnis

48. Paclik D, Berndt U, Guzy C, Dankof A, Danese S, Holzloehner P, Rosewicz S, Wiedenmann B, Wittig B, Dignass A *et al*: Galectin-2 induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes and ameliorates acute and chronic experimental colitis in mice. *J Mol Med* 2008, 86:1395-1406.
49. Peyrin-Biroulet L: Anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease: a huge review. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2010, 56:233-243.
50. Loser K, Sturm A, Voskort M, Kupas V, Balkow S: Galectin-2 Suppresses Contact Allergy By Inducing Apoptosis in Activated CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology* 2009, 182:5419-5429.
51. Hokama A, Mizoguchi E, Sugimoto K, Shimomura Y, Tanaka MY, Rietdijk ST, Jong PP, Snapper CB, Terhorst C, Richard S, Blumberg *et al*: Induced Reactivity of Intestinal CD4+ T Cells with an Epithelial Cell Lectin, Galectin-4, Contributes to Exacerbation of Intestinal Inflammation. *Immunity* 2004, 20:681-693.
52. Paclik D, Lohse K, Wiedenmann B, Dignass A, Sturm A: Galectin-2 and -4, But Not Galectin-1, Promote Intestinal Epithelial Wound Healing In Vitro Through a TGF-beta-independent Mechanism. *Inflamm Bowel Dis* 2008, 14:1366-1372.
53. Schmidt EL: Vergleich der Expressionen verschiedener Matrixproteine und Entzündungsmediatoren in HUVEC-Fibrochondrozyten-Cokulturen und Fibrochondrozyten-Monokulturen, unv. Dissertation, Universität Tübingen 2007
54. Remmele W, Hildebrand U, Hienz HA, Klein PJ, Vierbuchen M, Behnken LJ, Heicke B, Scheidt E: Comparative histological, histochemical, immunohistochemical and biochemical studies on oestrogen receptors, lectin receptors, and Barr bodies in human breast cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1986, 2:127-147.
55. Best W, Beckett J, Singleton J, Kern F: Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976, 70:439-444.

Literaturverzeichnis

56. Rachmilewitz D: Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulfasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomized trial. *Br Med J* 1989, 298:82-86
57. Bradford M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72:248-254.
58. Joppien S, Maier SL, Wendling D: Experimentelle Doktorarbeit. München: Elsevier GmbH; 2010.
59. Anne Mathieu, Nathalie Nagy, Christine Decaestecker, Liesbeth Ferdinande, Klaas Vandenbroucke, Pieter Rottiers, Claude A. Cuvelier, Isabelle Salmon, Demetter P: Expression of galectins-1, -3 and -4 varies with strain and type of experimental colitis in mice. *Int J Exp Path* 2008, 89:438–446.
60. Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T: Immunohistochemical Localization of Six Galectin Subtypes in the Mouse Digestive Tract. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2009, 57:41–50.
61. Garín MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollón E, Wait R, Lechler RI: Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 2007, 109:2058-2065.
62. Sturm A, Leite A, Danese S, Krivacic K, West G, Mohr S, Jacobberger J, Fiocchi C: Divergent cell cycle kinetics underlie the distinct functional capacity of mucosal T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *GUT* 2004, 53:1624-1631.
63. Neurath MF, Mudter J: Apoptosis of T-cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications. *GUT* 2006, 56:293-303.

7 DANKSAGUNG

Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Andreas Sturm. Die klare Strukturierung der Arbeit, seine schnellen Rückmeldungen bei Fragen und seine Hilfsbereitschaft trugen im Wesentlichen zu dem Erfolg der Fertigstellung meiner Dissertation bei.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin im Labor Frau Dr. rer. nat. Daniela Paclik. Sie stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Ihre Hilfsbereitschaft und fortlaufende Unterstützung bei der Durchführung der Experimente seien an dieser Stelle besonders betont.

Auch möchte ich den Mitarbeitern im gastroenterologischen Labor im Forschungsgebäude des CVK und dem Team der Endoskopie der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie CVK danken. Sie haben mir jederzeit bei Fragen weitergeholfen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir während der gesamten Zeit zur Seite standen und mich unterstützt haben. In Motivationstiefs haben sie mich angetrieben und mich fortlaufend ermuntert diese Arbeit fertig zu stellen.

8 LEBENSLAUF

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

9 ERKLÄRUNG

„Ich, Carolin Schiffner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Intestinale Galektinexpressionsmuster bei chronisch entzündlich Darmerkrankten selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift