

Die Bedeutung von Galektin-2 und Galektin-4 im mukosalen Immunsystem

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

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

vorgelegt von

Daniela Paclik

aus Starnberg

September 2008

1. Gutachter: PD Dr. Andreas Sturm

2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Erdmann

Disputation am 16.03.09

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Gutachter Herrn Prof. Volker Erdmann für die Betreuung und fachliche Begutachtung seitens der FU Berlin herzlich bedanken.

Für die hervorragende Betreuung – auch in schwierigen Situationen – möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Dr. Andreas Sturm bedanken. Seine Diskussionsbereitschaft, seine spannenden Anregungen und sein Ideenreichtum waren mir stets eine große Hilfe und Motivation. Seine fortwährende Unterstützung hat mir diese interessante Doktorarbeit ermöglicht.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Axel Dignass, der mir seinerzeit den Weg in das Labor eröffnet hat.

Bei Herrn Prof. Bertram Wiedenmann, dem Ärztlichen Direktor m. S. Hepatologie und Gastroenterologie der Charité, Campus Virchow Klinikum, möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gab meine Dissertation in seiner Abteilung zu verfassen.

Dank schulde ich zuletzt natürlich meinen Kollegen für die schöne Zusammenarbeit, die vielen hilfreichen Ratschläge und das liebevolle Zellen-Sitting.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Aufbau und Funktion der intestinalen Barriere	4
1.2. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	7
1.3. Galektine.....	8
1.4. Galektin-2 und Galektin-4	11
1.5. Zielsetzung der Arbeit	12
2. Ergebnisse	13
2.1. Galectin-2 and -4, but not Galectin-1, promote intestinal epithelial wound healing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism	13
2.1.1. Zusammenfassung	13
2.1.2. Publikation.....	14
2.2. Galectin-4 controls intestinal inflammation by selective regulation of peripheral and mucosal T cell apoptosis and cell cycle.....	15
2.2.1. Zusammenfassung	15
2.2.2. Publikation.....	16
2.3. Galectin-2 induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes and ameliorates acute and chronic experimental colitis in mice.....	17
2.3.1. Zusammenfassung	17
2.3.2. Publikation.....	18
3. Diskussion	19
4. Zusammenfassung	24
5. Summary	26
Literaturverzeichnis	28
Publikationsliste	32
Anhang	33
Abkürzungen.....	33
Originalartikel.....	34

1. Einleitung

1.1. Aufbau und Funktion der intestinalen Barriere

Die mukosale Schleimhaut des Darmes steht mit einer Gesamtoberfläche von über 100 m² in direktem Kontakt mit der Außenwelt und stellt somit die größte Barriere für schädliche Antigene und pathogene Organismen dar. Die intestinale Mukosa ist einer kontinuierlichen Exposition von Antigenen und kommensalen Bakterien, die über die Nahrung aufgenommen werden bzw. symbiotisch im Darm leben, ausgesetzt. Angesichts dieser permanenten Stimulation ist ein Gleichgewicht zwischen einer Toleranz gegenüber unschädlichen Antigenen und der Immunabwehr gegenüber pathogenen Antigenen eine besondere Herausforderung für das mukosale Immunsystem (1). Anatomisch setzt sich die mukosale Barriere aus verschiedenen Zellschichten zusammen. Luminalseitig zuoberst liegt das einschichtige intestinale Epithel, in dem die einzelnen Epithelzellen durch interzelluläre Tight Junctions miteinander verbunden sind. In diese Epithelschicht eingelagert befinden sich Becherzellen, M-Zellen sowie Paneth-Zellen. Unterhalb des Epithels beginnt die Lamina propria, in der Antigen-präsentierende Zellen (APC), wie z.B. Makrophagen und dendritische Zellen, sowie T-Zellen und B-Zellen lokalisiert sind (Abb. 1).

Das intestinale Epithel stellt eine hochselektive Barriere dar, die auf der einen Seite die Passage potentiell toxischer Stoffe, wie z.B. von der intestinalen Mikroflora produzierte Endotoxine, in den Wirt verhindert, aber auf der anderen Seite die Aufnahme von Nährstoffen aus dem intestinalen Lumen in die Zirkulation erlaubt. Dieses antigen-unspezifische Abwehrsystem besteht aus verschiedenen Komponenten, wie z.B. der physiologischen Barriere (Temperaturunterschiede, variierende pH-Werte), chemischen Mediatoren (Lysozyme, Komplementfaktoren oder Defensine), der anatomischen Barriere (Mukosa), der phagozytotischen Barriere (Phagozytose und Internalisierung von Antigenen) und der entzündlichen Barriere (Chemotaxis, Freisetzung von Akutphase-Proteinen, Vasodilatation) (2). Während einer Entzündungsreaktion werden die verschiedenen Abwehrmechanismen induziert und bestimmte Proteine, wie z.B. die Defensine, werden hochreguliert. Diese haben antimikrobielle Wirkung auf ein breites Spektrum von Pilzen und Bakterien (3). Zusätzlich sondern die Zellen der intestinalen

Mukosa Mukus zum Darmlumen hin ab, der aus Glykoproteinen und Phospholipiden besteht und die Glykokalyx bildet (4). Der abgesonderte Mukus ist hydrophob und verhindert die Adhäsion von Mikroorganismen und schützt das Epithel vor chemischen und mechanischen Verletzungen (5).

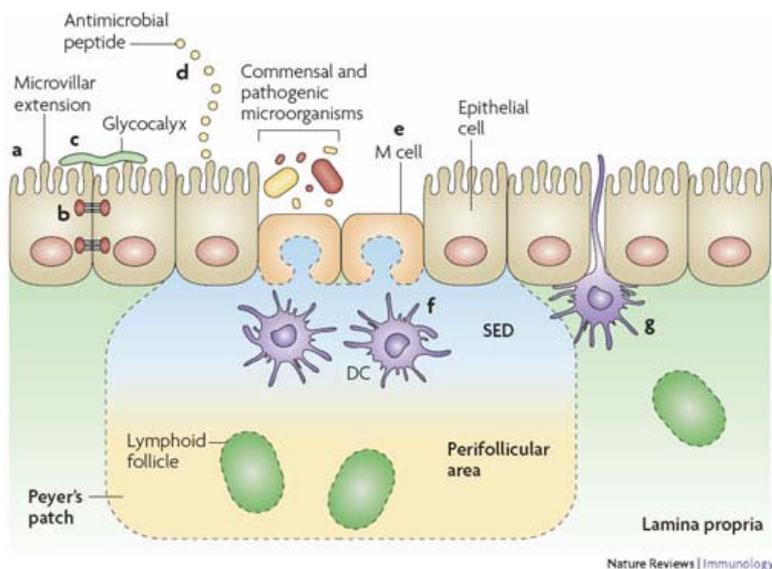


Abb. 1: Die intestinale Schleimhaut: Die intestinale Schleimhaut setzt sich aus einem einschichtigen Epithel und der darunter liegenden Lamina propria zusammen. In dieser Schicht eingelagert befinden sich die Peyer's patches, die Lymphfollikel dendritische Zellen und M-Zellen enthalten.

Eine weitere wichtige Eigenschaft des Darmepithels ist seine besondere Fähigkeit zu einer schnellen Wiederherstellung der Integrität des Oberflächenepithels nach Verletzungen. Das intestinale Epithel kann sich bedingt durch eine hohe Proliferationsrate innerhalb von 24 bis 96 Stunden vollständig erneuern (6; 7). Das proliferative Epithelzellkompartiment ist in den intestinalen Krypten lokalisiert und räumlich von einem funktionellen Epithelzellkompartiment getrennt, das zum Teil aus hochdifferenzierten Epithelzellen im Bereich der intestinalen Villi besteht. Epithelzellen des funktionellen Epithelzellkompartiments migrieren in Richtung Villusspitze und durchlaufen dabei eine zunehmende Differenzierung und Spezialisierung.

Der Prozess des Wundverschlusses und der Rekonstruktion der intestinalen Barriere wird als Restitution bezeichnet und lässt sich vereinfacht in drei Stufen einteilen. Zu Beginn findet eine Migration benachbarter Epithelzellen in die verletzte Region statt. Dazu bilden die Epithelzellen pseudopodien-ähnliche Strukturen aus, die sich nach dem Abdecken der Wunde durch Reorganisation des Cytoskeletts zurückbilden. Diesem

Prozess liegt keine Zellproliferation zu Grunde; er vollzieht sich binnen Minuten bis Stunden nach einer Verletzung (5). Im zweiten Schritt kommt es zur Epithelzellproliferation, welche dann konsekutiv die Anzahl der migrierten Zellen ersetzt. Im dritten Schritt differenzieren die Zellen aus, um ihre volle Funktionalität wieder zu erlangen und damit die Regeneration der mukosalen Barriere abzuschließen.

Die Lamina Propria stellt eine komplexe immunologische Barriere dar und ist hauptsächlich für die erworbene, antigen-spezifische Immunabwehr verantwortlich. Das Immunsystem kann mit hoher Selektivität zwischen Pathogenen und der apathogenen, residenten Standortflora unterscheiden, wobei pathogene Keime nach spezifischen Antikörperreaktionen rasch eliminiert werden und eine systemische Immunreaktion auf Nahrungsmittelantigene und Antigene der physiologischen Darmflora unterdrückt wird (8).

Im Gegensatz zur unspezifischen Abwehr ist die erworbene Abwehr antigen-spezifisch, verfügt über ein immunologisches Gedächtnis und kann zwischen Fremd- und Selbst-Antigenen unterscheiden. Die zellulären Bestandteile des antigen-spezifischen Immunsystems sind professionelle antigenpräsentierende Zellen, wie dendritische Zellen oder Makrophagen, B- und T-Lymphozyten (8).

Für die Initiierung der erworbenen Immunabwehr wird das Antigen durch antigenpräsentierende Zellen aufgenommen und das opsonierte Peptid den T-Zellen präsentiert. Durch die antigen-vermittelte Stimulierung der T-Zellen kommt es zur Aktivierung, Expansion und Differenzierung spezifischer T-Zellpopulationen, die zu einer Eliminierung der Pathogene führen.

Eine optimale Funktion der oben genannten Zellen und die Aufrechterhaltung der Barriere sind von entscheidender Bedeutung für die Bewahrung der intestinalen Immunhomeostase. Folglich kann eine Verschiebung dieses sensiblen Gleichgewichts zwischen Toleranz und Abwehr Allergien, Entzündungsreaktionen oder maligne Transformationen zur Folge haben.

1.2. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) kommt es durch eine genetische Prädisposition, ausgelöst durch externe Faktoren, zu einer Fehlregulation und damit Fehlfunktion des mukosalen Immunsystems (1). Obwohl die genauen Ursachen für CED bisher noch unklar sind, ist unumstritten, dass mukosal lokalisierte Lamina propria T-Zellen (LPT) bei dieser pathologischen Immunreaktion eine entscheidende Rolle spielen (9). Während der Initiierung und des Krankheitsverlaufes von CED kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Aktivierung, Proliferation und Apoptose von LPT und dadurch zu einer unkontrollierten Migration und Anreicherung aktivierter T-Zellen in die intestinale Mukosa. Diese rekrutieren durch Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen aktivierte Neutrophile, dendritische Zellen, Makrophagen und natürliche Killerzellen, die die ausgelöste Immunantwort verstärken. Diese unkontrollierte Immunantwort führt durch die Ausschüttung von Zytokinen, wie z.B. Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin (IL)-4 sowie reaktiven Sauerstoffradikalen zu einer Zerstörung der Epithelzellschicht und somit ihrer Barrierefunktion. (10). Diese positive Rückkopplung und die resultierende überschießende Immunantwort auf luminale Antigene hat eine Entzündungsreaktion im Darm zur Folge (11). Eine sofortige Wiederherstellung der Barriere durch Wundheilung und Restitution um die selektive Permeabilität wieder herzustellen sowie eine Herunterregulation der Immunantwort sind daher notwendige zentrale Mechanismen, um die Entzündung einzudämmen.

Während bis vor relativ kurzer Zeit die meisten therapeutischen Möglichkeiten (wie z.B. Cortison, Azathioprin oder 6-Mercaptopurin) unspezifisch die Funktion des Immunsystems blockierten, haben Fortschritte in dem Verständnis der Pathogenese der CED die Möglichkeiten eröffnet, durch eine zielgerichtete („targeted“) Therapie logischer in den Entzündungsprozess einzugreifen. Bisher hat sich der Großteil der diesbezüglichen medikamentösen Ansatzpunkte auf die Blockierung einer und mehrerer Komponente/n des spezifischen proentzündlichen Signalweges fokussiert. Hier ist es gelungen, durch die Applikation von TNF- α Antikörpern bei einer grossen Zahl von Patienten die mukosale Entzündungsreaktion zu reduzieren. Es wird dabei angenommen, dass TNF- α Antikörper ihren Effekt durch die Induktion der mukosalen T-Zell- und Makrophagen-Apoptose vermitteln. Widersprüchlich ist jedoch, dass lösliche TNF- α -

Rezeptorinhibitoren, wie z.B. das Certolizumab, welches keine T-Zell-Apoptose induziert, auch ihren Effekt in der Behandlung der CED bewiesen haben. Diese scheinbar kontroversen Daten weisen darauf hin, dass die Wirkmechanismen der TNF- α -Antikörperstrategien noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnten. Neutralisierende Anti-TNF- α -Antikörper haben ihre Wirksamkeit auch bei der Behandlung der Colitis ulcerosa gezeigt (12). Leider spricht jedoch ein signifikanter Anteil der Patienten nicht auf die Behandlung mit TNF- α Antikörpern an. Zusätzlich limitieren ausgeprägte Nebenwirkungen und die hohen Kosten den Einsatz von neutralisierenden TNF- α -Antikörpern, welches die Notwendigkeit einer effektiveren und sichereren Behandlung von CED unterstreicht.

Ziel in der Behandlung der CED ist es, die mukosale Entzündungsreaktion vollkommen zu unterdrücken. Es ist daher notwendig, einen therapeutischen Ansatz zu finden, der nicht nur eine oder mehrere Komponente/n der spezifischen proinflammatorischen Entzündungskaskade blockiert, sondern auch natürliche antientzündliche Mechanismen des Körpers, welche bei CED entweder defekt oder inhibiert sind, regeneriert. Idealerweise beeinflusst dieses Medikament dabei nur die Funktion von Zellen, die aktiv an der mukosalen Entzündungsreaktion beteiligt sind. Weiterhin sollte dieses Medikament menschlichen Ursprungs sein, um anaphylaktische Reaktionen zu verhindern.

1.3. Galektine

Galektine sind zuckerbindende Proteine (Glykoproteine), die der Familie der Lektine zugeordnet werden. Sie sind durch charakteristische Konsensus Aminosäuren sowie ihre spezifische Bindung an β -Galaktoside definiert. Bisher wurden 15 Säugetiergalektine anhand dieser Charakteristika beschrieben (13). Galektine besitzen eine hochkonservierte Kohlenhydrat-Erkennungsregion (CRD) bestehend aus 135 Aminosäuren, die in 5-6 β -Faltblattstrukturen sandwichartig angeordnet sind. Diese Region ist für eine spezifische Erkennung von zuckerhaltigen Strukturen auf der Zelloberfläche verantwortlich (14; 15). Die Bindungsaffinität hängt dabei von der Anordnung der Zuckermoleküle ab und ist variabel.

Galektine werden aufgrund der Anzahl ihrer CRD sowie ihrer Struktur in drei verschiedene Untergruppen eingeteilt (Abb. 2) (16). Proto-Typ Galektine besitzen zwei identische CRD, die als Dimere nicht-kovalent verbunden sind. Das am besten untersuchte Galektin dieser Gruppe ist das Galektin-1 (Gal-1), weitere Vertreter sind Gal-2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 und -15. Der Chimera-Typ besteht aus einer C-terminalen CRD, die mit einer prolin-, glycin- und tyrosinreichen N-terminalen Region verbunden ist. Bisher ist Galektin-3 das einzige bekannte Mitglied dieser Untergruppe. Die Charakteristika der Tandem-Repeat-Galektine sind ihre zwei voneinander unterschiedlichen CRD. Zu ihnen gehören Gal-4, -6, -8, -9 und -12 (Abb. 2).

Darüber hinaus können Galektine auch in verschiedenen Isoformen vorkommen, die nicht mehr nur auf eine dieser Gruppeneinteilungen beschränkt sind. Gal-8 kommt beispielsweise in sechs Isoformen vor, von denen drei dem Tandem-Repeat, die anderen drei dem Proto-Typ zuzuordnen sind (17).

Obwohl allen Galektinen ein Signalpeptid für die Sekretion fehlt, können Galektine sowohl intrazellulär vorkommen als auch sezerniert werden. Die Sekretion erfolgt daher nicht über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi Apparat, sondern über einen nicht-klassischen Signalweg (18). Extrazellulär können Galektine Dimere oder Oligomere bilden und so nicht nur an ein spezifisches Kohlenhydratmuster binden, sondern die jeweiligen Oberflächenrezeptoren quervernetzen (Abb. 2).

Durch diese Fähigkeit, nicht nur Rezeptoren einer Zelle, sondern auch verschiedene Zelltypen über die Bindung ihrer Rezeptoren zu vernetzen, steht Galektinen ein breites Spektrum von Signaltransduktionswegen offen. (19; 20).

Zu den extrazellulären Funktionen der Galektine zählen z.B. die Zell-Aktivierung, die durch Gal-1 herunterreguliert wird und die Adhäsion und Migration, die durch Gal-1 gesenkt und durch Gal-3 gesteigert wird. Galektine können als Zellzyklusregulatoren fungieren wie z.B. Gal-1, das den Zellzyklus inhibiert. Es wurde außerdem der inhibierende Einfluss von Gal-2 auf die Zytokinexpression und -sekretion nachgewiesen sowie die Induktion der Apoptose aktivierter T-Zellen durch Gal-1 und Gal-2 (21-23). Zu den intrazellulären Funktionen gehören die Regulation verschiedener grundlegender Signalwege wie die Regulation des Zellzyklus, Wachstum, Apoptose und pre-mRNA Splicing. Allerdings kann ihre Wirkungsweise konträr zu ihrer extrazellulären Funktion sein. Für Gal-3 wurde beispielsweise gezeigt, dass es extrazellulär Apoptose inhibieren kann, intrazellulär diese aber auslöst (24; 25). Der intrazelluläre Mechanismus basiert

dabei mehr auf Protein-Protein Interaktionen als auf Kohlenhydratbindung, wobei bisher noch keine Bindungsstelle für die Proteinbindung charakterisiert wurde (19).

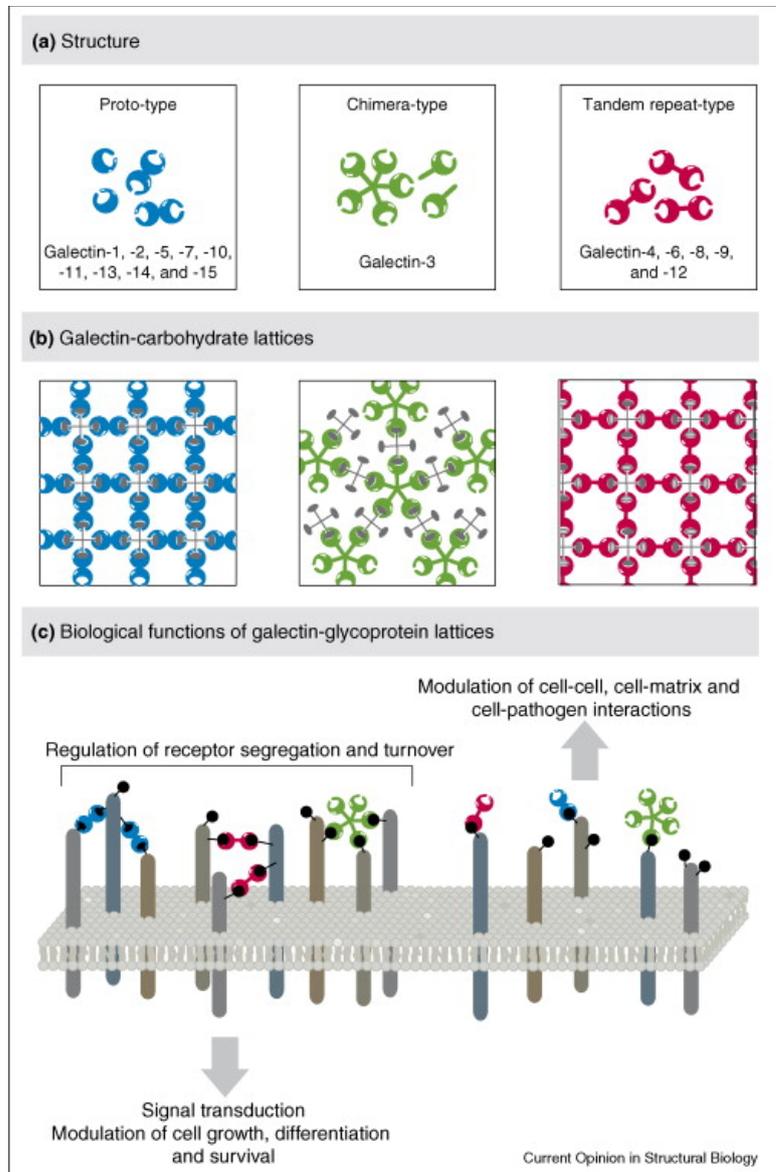


Abb. 2: Struktur, Quervernetzung und Funktion der Galektin-Familie: a) Galektine unterschiedlicher Struktur (Proto-, Chimera- und Tandem-Repeat-Typ) können Mono-, Di- oder Oligomere bilden. b) Galektine bilden strukturelle Netzwerke miteinander über Kohlenhydratbindung. c) Die Bindung oder Quervernetzung von Oberflächenrezeptoren durch Galektine induziert verschiedene Signaltransduktionswege.

1.4. Galektin-2 und Galektin-4

Während einige Galektine von einer Vielzahl unterschiedlicher Organe exprimiert werden, werden andere, wie z.B. Gal-2 und Gal-4, hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt exprimiert (21; 26). Vorarbeiten in unserem Labor haben gezeigt, dass Gal-2 potent die Apoptose aktivierter, nicht jedoch ruhender T-Zellen initiiert. Gleichzeitig wird die Proliferation dieser Zellen nicht beeinflusst (23). Bei der Behandlung intestinaler Entzündungen ist genau dieser Effekt erwünscht, d.h. an der Entzündungsreaktion beteiligte, aktivierte T-Zellen auszuschalten, eine potentielle normale Immunantwort gegenüber Pathogenen aber unberührt zu lassen. Weiterhin wurde in Vorarbeiten nachgewiesen, dass Gal-2 die Zytokinsekretion aktivierter T-Zellen in Richtung eines T-Helfer-2-Profiles mit einer verminderten Sekretion von TNF- α und IFN- γ verschiebt. TNF- α spielt bei der Initiierung und Perpetuierung von CED eine zentrale Rolle, und seine Blockade ist, wie oben dargestellt, eine effektive Behandlungsstrategie ihrer Therapie (27-29).

Obwohl man von Gal-4 weiß, dass es hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt exprimiert wird (26), sind die Funktionen von Gal-4 auf das mukosale Immunsystem bisher unbekannt. Da Gal-2, als Proto-Typ Galektin und Gal-4, ein Tandem-Repeat-Struktur Galektin, strukturell verschiedenen Gruppen angehören war es für diese Arbeit von besonderem Interesse Unterschiede und Ähnlichkeiten ihrer Effekte auf das intestinale Immunsystem zu untersuchen.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Hypothese:

Basierend auf der Tatsache, dass Gal-2 und Gal-4 vorwiegend im Gastrointestinaltrakt exprimiert werden und der gezeigten pro-apoptotischen Wirkung von Galektinen, wird die Hypothese aufgestellt, dass Gal-2 und Gal-4 eine bislang noch unerkannte Funktion im mukosalen Immunsystem einnehmen. Sie könnten daher einen therapeutischen Effekt im Verlauf und in der Behandlung von mukosalen Entzündungsreaktionen, wie z.B. CED, haben.

Ziele:

1. Untersuchung der Expression, Sekretion und des Einflusses von Gal-2 und Gal-4 auf intestinale Epithelzellen, insbesondere im Hinblick auf Wundheilungsprozesse
2. Untersuchung des Einflusses von Gal-4 auf den Zellzyklus, die Aktivierung und die Apoptose von peripheren und Lamina propria T-Zellen
3. Untersuchung eines möglichen therapeutischen Effekts von Gal-4 auf den Verlauf einer experimentell induzierten Kolitis
4. Untersuchung eines möglichen therapeutischen Effekts von Gal-2 auf den Verlauf einer experimentell induzierten Kolitis

2. Ergebnisse

2.1. Galectin-2 and -4, but not Galectin-1, promote intestinal epithelial wound healing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism

2.1.1. Zusammenfassung

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kommt es durch eine unkontrollierte Immunreaktion zu einer Schädigung des mukosalen Darmepithels und daraus resultierend zu einer beeinträchtigten Barriere- und Schutzfunktion. Es ist bekannt, dass Galektine auf vielfältige Weise Entzündungs- und Autoimmunreaktionen beeinflussen, der Effekt auf Epithelzellen ist allerdings noch weitgehend ungeklärt. Daher sollte untersucht werden, ob Gal-2 und Gal-4, die bei Mäusen beide hauptsächlich im Darm exprimiert werden, die Wundheilung und Mukosarestitution von Epithelzellen modulieren können. Es konnte an zwei verschiedenen Epithelzelllinien nachgewiesen werden, dass Gal-2 und Gal-4 diese Zellen binden, von ihnen exprimiert und sezerniert werden. Auf der Suche nach möglichen Bindungsstellen wurde β -Catenin detektiert, ein zytosolisches Protein, das intrazellulär Komplexe mit unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren, z.B. E-Cadherin, bilden kann. In einem Wundheilungsassay, bei dem mit einer Rasierklinge ein Monolayer von konfluent gewachsenen Caco-2 Zellen verletzt wird, wurde der Effekt von Gal-2 und Gal-4 auf die Zellmigration und Restitution untersucht. Zusätzlich wurde der Effekt von Gal-1 getestet, das hauptsächlich außerhalb des Gastrointestinaltraktes exprimiert wird. Die Analyse zeigte eine signifikant erhöhte Migration unter Zugabe von Gal-2 und Gal-4 ($84 \pm 8 \%$ bzw. $150 \pm 10 \%$). Im Gegensatz dazu wurde die Migration durch Gal-1 inhibiert. Weiterhin konnte durch Zugabe TGF- β blockierender Antikörper gezeigt werden, dass die Gal-2- und Gal-4-induzierte Zellmigration unabhängig, die Blockierung durch Gal-1 allerdings in Abhängigkeit von TGF- β verläuft. Die anschließende Zellzyklusanalyse zeigte eine erhöhte Expression von Cyclin B1, einem zentralen Regulator der S- und G2-Phase, nach Zugabe von Gal-2 und Gal-4. Dagegen konnte nach Zugabe von Gal-1 eine reduzierte Cyclin B1 Expression und somit eine Inhibierung der Zellzyklusprogression beobachtet werden. Abschließend konnte gezeigt werden, dass weder Gal-2, noch Gal-4 die

Apoptose von Epithelzellen induzieren. Im Gegensatz hierzu kam es unter Zugabe von Gal-1 zu einer starken Apoptoseinduktion. Diese Experimente konnten zum ersten Mal zeigen, dass Gal-2 und Gal-4 *in vitro* die Epithelzellrestitution durch Initiierung der Migration und Zellzyklusaktivierung fördern können und damit eine wichtige Funktion bei Wundheilungsprozessen einnehmen.

2.1.2. Publikation

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 Oct;14(10):1366-72.

2.2. Galectin-4 controls intestinal inflammation by selective regulation of peripheral and mucosal T cell apoptosis and cell cycle

2.2.1. Zusammenfassung

Gal-4, ein zuckerbindendes Lektin aus der Galektin-Familie, wird fast ausschließlich in Dünndarm und Kolon exprimiert. In der folgenden Arbeit wurde der Einfluss von Gal-4 auf T-Zellen *in vitro* und in einem murinen Kolitismodell untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Gal-4 an den CD3-Rezeptor aktivierter T-Zellen bindet. Die Bestimmung der Apoptoserate stimulierter T-Zellen ergab einen dosisabhängigen signifikanten Anstieg apoptotischer T-Zellen unter Zugabe von Gal-4, wobei die Nekroserate nicht gesteigert wurde. Es zeigte sich, dass die induzierte Apoptose caspase-unabhängig verlief, da eine spezifische Blockierung von Caspase-3, -8 und -9 sowie eine allgemeine Blockierung der Caspasenaktivität durch zVAD, keinen Einfluss hatten. Weitere Untersuchungen caspase-unabhängiger Wege ergaben eine Inhibierung der Apoptoseinduktion durch Calpain-Inhibitoren. Diese calcium-abhängigen Proteasen wurden schon als zentrale Enzyme für den durch Galektin-9 induzierten Apoptoseweg beschrieben. Untersuchungen der unterschiedlichen Zellzyklusphasen ergaben eine signifikante Inhibierung der Zellzyklusprogression in verschiedenen Stadien des Zyklus. Cyclin A, das beim Übergang der G1- in die S-Phase gebildet wird, sowie Cyclin B1, das während der S- und G2-Phase akkumuliert, waren um $20 \pm 2 \%$ bzw. $57 \pm 6 \%$ herunterreguliert verglichen mit der Kultur ohne Gal-4. Auch die Messung des DNA-Gehaltes durch eine Propidium-Iodid-Färbung zeigte eine reduzierte Population stimulierter T-Zellen in der S- und G2/M Phase, was zu einer stark verringerten Expansion der T-Zellen, gemessen durch den membrangängigen Farbstoff CFDA, führte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der T-Zellen, gemessen anhand ihrer CD25 Expression, wie auch die Expression kostimulatorischer Moleküle, CD80 und CD86, durch Gal-4 signifikant reduziert wurden. Bei Untersuchungen der Zytokinsekretion wurde eine Reduktion von TNF- α , IL-6, -8 und -10 im Überstand stimulierter T-Zellen gemessen.

Für die *in vivo* Analysen wurde das Modell der Dextran Sodium Salt (DSS)-induzierten akuten Kolitis in Balb/c Mäusen gewählt. Dabei wird den Tieren für acht Tage 5 % DSS im Trinkwasser angeboten, gleichzeitig wurden die Mäuse zweimal täglich mit NaCl, als

Kontrolle, oder Gal-4 (1 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal. behandelt. Die Auswertung des Entzündungsgrades, makroskopisch und histologisch beurteilt durch etablierte Indizes, ergab eine signifikante Verbesserung der Entzündung bei den Gal-4-behandelten Tieren. *In situ* zeigte sich eine potente Induktion der Apoptose mukosaler mononukleärer Zellen (LPMC) durch Gal-4. Zusätzlich wurde durch Gal-4 die Sekretion von TNF- α um 40 ± 6 % reduziert, die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 wurde hingegen um 400 ± 7 % gesteigert. Außerdem ließen sich auch die *in vitro* gewonnenen Daten der Zellproliferation *in vivo* bestätigen. Der Nachweis erfolgte durch intraperitoneale Injektion von Bromdesoxyuridin 24 Stunden vor Versuchsende. Dieses verteilt sich im Körper, wird von den proliferierenden Zellen zur DNA-Synthese verwendet und kann anschließend durch einen spezifischen Antikörper in Gefrierschnitten angefärbt werden. Es zeigte sich eine deutlich gesenkte Expansion der Immunzellen in den Entzündungsherden verglichen mit den Kontrolltieren. Diese Untersuchungen konnten erstmals zeigen, dass Gal-4 zentrale T-Zellfunktionen beeinflusst, *in vivo* und *in vitro* die T-Zell-Apoptose induziert und die Entzündungsaktivität in einem Kollitismodell hemmt.

2.2.2. Publikation

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 Jul 9;3(7):e2629.

2.3. Galectin-2 induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes and ameliorates acute and chronic experimental colitis in mice

2.3.1. Zusammenfassung

2004 konnten Untersuchungen in unserem Labor zeigen, dass das immunmodulierende Lektin Gal-2 von intestinalen Epithelzellen exprimiert wird, an T-Zellen bindet und selektiv Apoptose in aktivierten, jedoch nicht in ruhenden, T-Zellen induziert. T-Zellen und eine gestörte T-Zell-Apoptose spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese von CED. Es sollte daher *in vivo* untersucht werden, ob Gal-2 einen therapeutischen Effekt in der Behandlung von CED hat.

Die entzündungsmodulierende Potenz von Gal-2 wurde anhand eines DSS-induzierten Kolitis-Modells untersucht. Die Kolitis wurde in Balb/c Mäusen durch die Gabe von 5 % DSS in ihrem Trinkwasser, entweder für acht Tage (akute Kolitis) oder für drei Zyklen von je acht Tagen DSS-Gabe gefolgt von acht Tagen DSS-Pause (chronische Kolitis), ausgelöst. Die Tiere wurden zweimal täglich intraperitoneal mit NaCl, Tacrolimus (0,1mg/kg Körpergewicht) oder Gal-2 (1mg/kg Körpergewicht) behandelt. Anschließend wurde anhand etablierter Indizes die Erkrankungsaktivität und Mukosaschädigung untersucht. Bei Mäusen mit akuter DSS-Kolitis bewirkt Gal-2 eine signifikante Verringerung des Entzündungsindex von $6,5 \pm 0,9$ Punkten in NaCl behandelten Kontrolltieren auf $2,4 \pm 0,7$ Punkte in Gal-2 behandelten Tieren ($p < 0,01$). Dieser Effekt war vergleichbar mit dem von Tacrolimus behandelten Tieren ($2,7 \pm 0,7$ Punkte). Ein vergleichbares Resultat wurde auch bei der chronischen DSS-Kolitis beobachtet. Die histologische Untersuchung des Darms ergab eine signifikante Abnahme der Mukosaschädigung und der intestinalen Entzündungsreaktion von Gal-2- und Tacrolimus-behandelten Tieren. Eine Messung der Myeloperoxidase-Aktivität, bei der eine signifikante Abnahme der Aktivität in Gal-2-behandelten Tieren festgestellt wurde, bestätigte diese Daten ebenfalls. Die Untersuchung der Zytokinsekretion in PBT, die mittels Cytometric Bead Array ermittelt wurde, ergab, dass Gal-2-behandelte Tieren signifikant weniger TNF- α und IFN- γ sezernierten, während die IL-5- und IL-10-Sekretion im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert war. Bei der Untersuchung der Apoptoserate an Gefrierschnitten des Darmes wurde eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen detektiert, die sich anhand von Doppelfärbungen als hauptsächlich

CD3-positive Zellen herausstellten. Diese Resultate wurden zusätzlich in einem T-Helfer-1-vermittelten Kolitismodell bestätigt. Hierbei wurde die Kolitis durch den Transfer von T-Zellen mit transgenem, ovalbumin-spezifischem T-Zell-Rezeptor (TCR) induziert. Diese Zellen wurden durch Injektion von Ovalbumin in den Darm aktiviert und lösen eine Entzündungsreaktion, die der einer Kolitis entspricht, aus. In den Gal-2-behandelten Mäusen konnten histologisch keine Anzeichen einer Kolitis festgestellt werden und der Entzündungsindex war vergleichbar mit dem, der gesunden Kontrolltiere. Diese Experimente konnten erstmals einen therapeutischen Effekt von Gal-2 in zwei unterschiedlichen Modellen der Kolitis nachweisen.

2.3.2. Publikation

Paclik D, Berndt U, Guzy C, Dankof A, Danese S, Holzloehner P, Rosewicz S, Wiedenmann B, Wittig B, Dignass A, Sturm A.

Galectin-2 induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes and ameliorates acute and chronic experimental colitis in mice.

J Mol Med. 2008 Dec;86(12):1395-406.

3. Diskussion

Die intestinale Barriere bietet im physiologischen Zustand einen effektiven Schutz gegenüber Pathogenen, die über den Darm in den Körper gelangen. Dieser Schutz wird im Verlauf von chronischen Darmerkrankungen zerstört. Eine schnelle Wiederherstellung der Barrierefunktion nach ihrer Schädigung ist von essentieller Bedeutung, um die normale Immunhomöostase wiederherzustellen und die Immunreaktion einzudämmen (5). Galektine beeinflussen auf vielfältige Weise immunologische Prozesse (30). In dieser Arbeit konnten verschiedene Mechanismen aufgezeigt werden, wie Galektine die Funktion des mukosalen Immunsystems beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass Gal-2 und Gal-4 von intestinalen Epithelzellen exprimiert werden, an diese binden und verschiedene zelluläre Prozesse, wie z.B. die Restitution des intestinalen Epithels, beeinflussen. Es konnte initial gezeigt werden, dass Gal-2 und Gal-4 einen positiven Effekt auf verschiedene Stufen der Epithelzellrestitution haben. Es wurden eine verstärkte Epithelzellmigration sowie ein gesteigerter Zellzyklus intestinaler Epithelzellen durch Gal-2 und Gal-4 gemessen. Der Mechanismus, über den diese beiden Galektine die Zellmigration auslösen, unterschied sich von den meisten anderen Wegen zur Initiierung der Zellrestitution. Diese wird häufig über die Sekretion von Zytokinen gesteuert, die über TGF- β -abhängige Signalwege die Restitution auslösen (31; 32). Eine Abhängigkeit von TGF- β konnte bei Gal-2 und Gal-4 nicht gefunden werden, was auf einen alternativen Signalweg, der in den Zuckerketten der Rezeptoren kodiert ist, hinweist. Eine gesteigerte Epithelzellrestitution unter Einfluss von Gal-1 wurde, im Gegensatz zur Wirkung von Gal-2 und Gal-4 auf diese, nicht festgestellt. Gal-1, ein Proto-Typ-Galektin mit einem breiteren Expressionsspektrum als Gal-2 und Gal-4, inhibierte sowohl die Migration wie auch den Zellzyklus intestinaler Epithelzellen. Diese Daten zeigen, dass die Signalübertragung durch Galektine ein sehr komplexer Prozess ist. Diesem liegt nicht nur die Galektinstruktur zugrunde, da Galektine einer Strukturfamilie gegensätzliche Effekte haben können. Andererseits übernehmen die strukturell unterschiedlichen Galektine, Gal-2 und Gal-4, ähnliche Funktionen, was an ihrem ähnlichen, begrenzten Vorkommen im Darm liegen könnte.

Ein weiterer Unterschied zwischen Gal-1 und Gal-2 bzw. Gal-4 lag in ihrem Effekt auf die Apoptoseinduktion von intestinalen Epithelzellen. Während es durch Gal-1 zu einer Steigerung der Apoptose kam, blieb diese durch Gal-2 und Gal-4 unbeeinflusst. Eine gesteigerte Apoptose kann in einer bereits entzündeten Mukosa für eine zusätzliche Schädigung des Epithels und der Barrierefunktion sorgen, was eine Intensivierung der Entzündungsreaktion zur Folge hätte. Daher ist eine Balance zwischen Apoptose und Proliferation, wie für Gal-2 und Gal-4 gezeigt, von entscheidender Bedeutung im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Effekt. Die Eigenschaften von Gal-2 und Gal-4, die intestinale epitheliale Wundheilung durch eine Modulation der intestinalen epithelialen Migration und Proliferation zu stimulieren, könnten somit eine neue Möglichkeit darstellen, epitheliale Wundheilungsvorgänge *in vivo* zu modulieren.

Bei der Initiierung und dem Verlauf von CED nimmt die überschießende Stimulation und eine gestörte Apoptose von Lamina propria T-Zellen eine zentrale Rolle ein. Mukosale T-Zellen sind bei der Entzündungsreaktion für eine anhaltende Immunreaktion und Schädigung der Mukosa verantwortlich. In Untersuchungen des Einflusses von Gal-4 auf T-Zellen konnte gezeigt werden, dass Gal-4 die Aktivierung stimulierter T-Zellen *in vitro* inhibiert. Untersuchungen der Zytokinexpression ergaben eine Hemmung der Expression und Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF- α , IL-6, IL-8 und IL-17. Diese Hemmung könnte eine direkte Folge der inhibierten Aktivierung sein. Dieser Einfluss ist für die Eindämmung der unkontrollierten Immunreaktion von entscheidender Bedeutung, um eine weitere Stimulation immunreaktiver Zellen, wie z.B. Makrophagen, Granulozyten und B-Zellen, und ihre Migration zum Entzündungsherd zu verhindern. Durch den Nachweis, dass Gal-4 an den CD3-Rezeptor aktivierter, nicht jedoch ruhender T-Zellen bindet, stellt der Effekt auf T-Zellen eine Möglichkeit zur spezifischen Modulation immunreaktiver T-Zellen dar. Der CD3-Rezeptor ist für die T-Zell-Aktivierung und die darauf folgende Zellexpansion verantwortlich. Untersuchungen verschiedener regulierender Elemente des Zellzyklus, sowie Untersuchungen der Zellexpansion, ergaben eine Inhibierung beider Prozesse unter dem extrazellulären Einfluss von Gal-4. Die Wirkung von Gal-4 ist vermutlich mit einem Signal über den TCR verknüpft, da eine endogene Blockade von Gal-4 keine modulierende Wirkung auf den Zellzyklus ergab.

Neben der unkontrollierten Immunantwort, die unter anderem durch T-Zell-Stimulierung und Zytokinproduktion vorangetrieben wird, ist wie oben erwähnt eine Funktionsstörung in der T-Zell-Apoptose ein zentraler Mechanismus beim Verlauf von CED. Untersuchungen in dieser Richtung bestätigten, wie auch schon für andere Galektine beschrieben (23; 33), eine potente Induktion der Apoptose durch die extrazelluläre Gabe von Gal-4. Die zugrunde liegende calpain-abhängige Induktion wurde bereits für Gal-9, ebenfalls ein Tandem-Repeat-Galektin, als zentraler Mechanismus der Apoptose in MOLT-Zellen, einer T-Zelllinie, beschrieben (34). Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde auch festgestellt, dass es bei Jurkat-Zellen, einer leukämischen T-Zelllinie, ebenfalls zur Apoptoseinduktion kommt. Diese ist nicht von Calpain-Proteasen abhängig, kann aber caspase-abhängig oder -unabhängig verlaufen (35). Es scheinen innerhalb einer Strukturfamilie der Galektine gleiche Signalwege zur Apoptoseinduktion benutzt zu werden. Gleichzeitig ist ein breites Wirkungsspektrum zu vermuten, da es bei gleichen Signalen auf verschiedenen Zellen zur Verwendung verschiedener Signalwege kommt. Diese erstmals beschriebenen Effekte weisen darauf hin, dass Gal-4 wichtige Funktionen in der Aktivierung, Regulation und auch Modulation des Immunsystems beeinflusst. Zusätzlich spielen in diesem komplexen Netzwerk der Signalübertragung neben der exogenen Wirkung auch die endogenen Effekte von Gal-4 eine Rolle. Um weiteren Aufschluss über die Rolle von Gal-4 bei der möglichen Wiederherstellung natürlicher antiinflammatorischer Systeme zu erhalten und diese auf den Organismus zu übertragen, wurden die beschriebenen Effekte *in vivo* betrachtet. Anhand eines akuten Kolitismodells in der Maus konnte gezeigt werden, dass es durch die Behandlung mit Gal-4 zu einer signifikanten Verbesserung der klinischen sowie der histologischen Merkmale im Verlauf der Kolitis kam. Die Verbesserung wurde begleitet von einer verminderten Einwanderung immunreaktiver Zellen in die Mukosa, was vermutlich auf eine verminderte Aktivierung der Zellen unter dem Einfluss von Gal-4 zurückzuführen ist. Diese Zellen zeigen, verglichen mit jenen von unbehandelten Mäusen, eine geringere Zytokinsekretion, was ebenfalls eine verminderte Aktivierung nahe legen könnte. 2004 zeigten Hokama und Mitarbeiter, dass bei einer experimentell induzierten Kolitis während einer Behandlung mit Gal-4 die Entzündungsparameter erhöht waren. Gleichzeitig war die IL-6 Produktion bei den Gal-4-behandelten Tieren gesteigert (36). Wie die *in vitro* Daten der vorliegenden Arbeit zeigen konnten, bindet Gal-4 an den stimulierten TCR und induziert, vermutlich darüber, bestimmte Signaltransduktionswege.

Die gegensätzlichen Ergebnisse dieser und der Arbeit von Hokama und Mitarbeitern ist vermutlich dadurch zu erklären, dass die von ihnen verwendeten Mäuse TCR-knock-out-Mäuse waren. Daher kann man davon ausgehen, dass Gal-4 in diesen Versuchen einen anderen Rezeptor als Bindungsstelle nutzte und dadurch andere Signalwege induzierte. Bezüglich IL-6 ist bekannt, dass eine Blockierung des löslichen IL-6 Rezeptors zu einer Unterdrückung der Kolitis verbunden mit Induktion von Apoptose in inflammatorischen Zellen führt (37). An Entzündungsherden in der Mukosa wurde bei Gal-4-behandelten Tieren eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen gefunden. Die Apoptoseinduktion wird vermutlich entweder über eine direkte Interaktion von Gal-4 mit den inflammatorischen Zellen oder indirekt über eine Regulation der Zytokinsekretion ausgelöst. Die verminderte Zellmigration und Zytokinsekretion inflammatorischer Zellen sowie die gesteigerte Apoptose, könnten den positiven, therapeutischen Effekt von Gal-4 im Verlauf der Kolitis erklären.

In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass Gal-2 ebenfalls spezifisch die Apoptose aktivierter T-Zellen auslöst (23). Diese Induktion verläuft, anders als bei Gal-4, nicht über Calpain, sondern wird in Abhängigkeit von Caspase-3, Caspase-9 und der Bax/Bcl-Ratio gesteuert. Zusätzlich kommt es zu einer Abnahme der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ und zu einer verminderten Adhäsion von T-Zellen an das Epithel (23). Die Translation dieser Ergebnisse in ein akutes und ein chronisches Kolitismodell sollte weiteren Aufschluss über den möglichen therapeutischen Effekt und die Wirkungsweise von Gal-2 *in vivo* geben. Bei Behandlung der Tiere mit Gal-2 kam es sowohl im akuten als auch im chronischen Kolitismodell zu einer signifikanten Verbesserung der typischen klinischen Symptome, wie z.B. Diarrhoe, blutiger Stuhl und Gewichtsverlust. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit den Ergebnissen, die durch die Gabe von Tacrolimus (38), einem starken Immunsuppressivum, erzielt wurden.

Untersuchungen des Expressionsprofils von Gal-2 zeigten eine Abnahme der Gal-2-Expression in Epithelzellen kranker Tiere. Im Gegensatz dazu wird Gal-2 im gesunden Darm von Mäusen von Epithelzellen entlang des gesamten Darmes exprimiert (23; 26). Dieser Effekt wurde ebenfalls bei Gal-1 in einer TNBS-induzierten Kolitis (33) und bei Patienten mit einer juvenilen idiopathischen Arthritis festgestellt, eine Erkrankung, die wie die CED auf einer gestörten T-Zell-Apoptose beruht (39). Durch die Behandlung der Tiere mit Gal-2 konnte die normale Expression von Gal-2 in den Epithelzellen

wiederhergestellt werden, was eine zentrale Rolle von Gal-2 im Krankheitsverlauf der Kolitis andeutet. Da es im Verlauf von CED zu einer gestörten T-Zell-Apoptose kommt, könnte die verminderte Gal-2 Expression ein entscheidender Hinweis auf den Mechanismen des therapeutischen Effektes von Gal-2 sein. Diese Vermutung ließ sich durch die Ergebnisse bekräftigen, dass es nach einer Gal-2-Behandlung zur Apoptoseinduktion inflammatorischer Zellen der Lamina propria kommt. Histologische Untersuchungen ergaben eine verminderte Anzahl in die Lamina propria eingewanderter, inflammatorischer Zellen sowie eine Abnahme der Mukosaschädigung. Die Funktionalität der inflammatorischen Zellen im Darm hinsichtlich ihrer Zytokinsekretion ergab eine verminderte Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-12 und IL-6, beides wichtige Mediatoren der Entzündungsreaktion (40; 41). Diese Regulation proinflammatorischer Zytokine trägt ebenfalls zur Verbesserung der Entzündung bei, da bei der Behandlung von CED die Wiederherstellung der natürlichen Balance zwischen Zellaktivierung, Proliferation und Zelltod eine entscheidende Rolle spielt. In Übereinstimmung mit den positiven Effekten, die durch eine Behandlung mit Gal-2 in beiden Modellen der DSS-induzierten Kolitis erzielt wurden, konnte der therapeutische Effekt von Gal-2 zusätzlich in einem T-Zell-Transfer-Modell einer T-Helfer-1-vermittelten Kolitis gezeigt werden. Die dargelegten Ergebnisse zeigen, dass sowohl Gal-2 als auch Gal-4 eine zentrale und wichtige Rolle in verschiedenen immunologischen Systemen einnehmen. Ihre immunmodulierende Wirkung und ihr positiver Effekt auf die Epithelzellrestitution eröffnen eine neue therapeutische Option in der Behandlung von CED.

4. Zusammenfassung

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen handelt es sich um Erkrankungen, die durch eine überschießende Immunantwort gekennzeichnet sind. Diese ist verbunden mit einer gestörten T-Zellapoptose. Das daraus resultierende Ungleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose sorgt für eine anhaltende Entzündungsreaktion in der intestinalen Mukosa. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu Schäden an der Mukosa, welche konsekutiv ihre Barrierefunktion verliert. Galektine sind zuckerbindende Lektine, die auf vielfältige Art Prozesse, wie z.B. Zellaktivierung, Proliferation, Zytokinsekretion, Migration und Apoptose, beeinflussen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Gal-2 und Gal-4 auf das mukosale Immunsystem *in vivo* und *in vitro* untersucht. Diese beiden Galektine wurden gewählt, da sie nahezu exklusiv im Gastrointestinaltrakt exprimiert werden. Anhand eines etablierten Wundheilungsmodells mit Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass Gal-2 und Gal-4 die intestinale Epithelzellrestitution fördern. Dabei wurden die Migration und Proliferation intestinaler Epithelzellen gesteigert. Untersuchungen an T-Zellen aus dem peripheren Blut und aus der Lamina propria zeigten, dass Gal-2 an den β 1-Integrin und Gal-4 an den CD3-Rezeptor auf der T-Zell-Oberfläche bindet. Die Interaktion beider Galektine mit T-Zellen initiiert eine gesteigerte Apoptose stimulierter, jedoch nicht ruhender T-Zellen. Die durch Gal-2 induzierte Apoptose verläuft über die Aktivierung von Caspase-3 und -9. Gal-4 induziert Apoptose caspase-unabhängig über einen calpain-abhängigen Signalweg. Weiterhin ergaben Untersuchungen der Zytokinsekretion eine Hemmung proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF- α , IL-6, IL-8 und IL-17 durch beide Galektine. Die Ergebnisse der Zellzyklusanalysen zeigten eine Hemmung des Zellzyklus von T-Zellen durch Gal-4, jedoch nicht durch Gal-2.

In vivo Untersuchungen in einem DSS-induzierten Kolitis Modells in der Maus zeigten, dass es durch Gal-2 und Gal-4, im Vergleich zur Kontrollgruppe, zu einer signifikanten Verbesserung der klinischen und histologischen Entzündungsreaktion kommt. Dabei konnte eine verminderte Infiltration von inflammatorischer Zellen in den Darm sowie eine Abnahme der Mukosaschädigung gezeigt werden. Zusätzlich wurde durch die Gal-4-Behandlung die Anzahl proliferierender Zellen in der Mukosa, gesenkt. Untersuchungen der Lymphozytenfunktionalität durch Analyse der Zytokinsekretion

ergaben eine verringerte Sekretion proinflammatorischer Zytokine. Gleichzeitig war das antiinflammatorische Zytokin IL-10 bei der Behandlung mit Gal-4 erhöht. Untersuchungen zur Apoptose zeigten eine signifikante Steigerung apoptotischer CD3-positiver Zellen in der Mukosa nach Behandlung mit Gal-2 und Gal-4. Diese Ergebnisse legen eine zentrale Rolle von Gal-2 und Gal-4 auf unterschiedliche Prozesse und Zellarten im mukosalen Immunsystem dar.

5. Summary

Inflammatory bowel diseases are characterised by an uncontrolled immune reaction in common with an impaired T cell apoptosis. The resulting imbalance between proliferation and apoptosis induces a persistent inflammation in the intestinal mucosa. Furthermore, the persistent mucosal damage impairs the epithelial cell function and its barrier function. In our work we analysed the effect of galectin-2 and galectin-4 on the mucosal immune system. Galectins are a family of sugar-binding lectins which more and more emerged as major regulator of different signaling processes, including cell activation, proliferation, cytokine secretion, migration and apoptosis. Since galectin-2 and galectin-4 are mainly expressed in the gastrointestinal tract, we focussed on those two lectins. A wound healing assay with epithelial cells showed that galectin-2 and -4 promote epithelial cell restitution, with an increase in cell migration and cell proliferation. Analysis of the interaction of both galectins with peripheral blood T cells revealed that galectin-2 binds to the β 1-integrin at the cell surface while galectin-4 binds at the CD3 Receptor of stimulated T cells. Both galectins induced apoptosis of stimulated, but not resting T cells. Galectin-2 induced apoptosis via caspase-3 and caspase-9 dependent pathways. In contrast, apoptosis induced by galectin-4 was caspase-independent, but calpain-dependent. Determination of the cytokine secretion profile of T cells revealed a decrease in pro-inflammatory cytokines, like TNF- α , IL-6, IL-8 and IL-17, when incubated with galectin-2 or galectin-4. Cell cycle analyses showed an inhibitory effect of galectin-4 on cell cycle progression of T cells, while galectin-2 did not influence the cell cycle.

In a model of DSS-induced colitis in mice, galectin-2 and -4 treatment significantly ameliorated clinical and histological signs of colitis compared to controls. Both lectins reduced the number of inflammatory cells migrated into the mucosa and diminished mucosal damage. In addition, galectin-4 decreased the number of proliferating cells in the intestinal mucosa. Analyses of the cytokine secretion profile showed a lowered secretion of pro-inflammatory cytokines. Furthermore, the anti-inflammatory cytokine IL-10 was increased in mice treated with galectin-4. Determination of apoptosis in mice treated with galectin-2 or galectin-4 showed a significant increase in apoptotic CD3

positive cells in the mucosa. Thus, our study provided for the first time evidence that galectin-2 and galectin-4 play a central and distinct role in the mucosal immune system.

Literaturverzeichnis

1. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427-434.
2. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Overview of the Immune Systemw. In: Goldsby RA, Kindt TJ, and Osborne BA, eds. *Immunology*. New York: Freemann, 2000:3-26.
3. Selsted ME, Miller SI, Henschen AH, Ouellette AJ. Enteric Defensins - Antibiotic Peptide Components of Intestinal Host Defense. *Journal of Cell Biology* 1992;118:929-936.
4. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003;3:331-341.
5. Sturm A, Dignass AU. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:348-353.
6. Dignass AU. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. *Inflammatory Bowel Diseases* 2001;7:68-77.
7. Potten CS, Kellett M, Roberts SA, Rew DA, Wilson GD. Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. *Gut* 1992;33:71-78.
8. Mackay IR, Rosen FS. The Immune System - First of Two Parts. *N Engl J Med* 2000;341:37-49.
9. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182-205.
10. Baumgart DC, Dignass AU. Intestinal barrier function. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2002;5:685-694.
11. Podolsky DK. Inflammatory Bowel-Disease .1. *New England Journal of Medicine* 1991;325:928-937.
12. Sandborn WJ, Hanauer SB. Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agents, pharmacology, clinical results, and safety. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:119-133.
13. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, . Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994;76:597-598.
14. Kasai K, Hirabayashi J. Galectins: A family of animal lectins that decipher glycocodes. *Journal of Biochemistry* 1996;119:1-8.

15. Rabinovich GA. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ* 1999;6:711-721.
16. Hirabayashi J, Kasai K. The Family of Metazoan Metal-Independent Beta-Galactoside-Binding Lectins - Structure, Function and Molecular Evolution. *Glycobiology* 1993;3:297-304.
17. Bidon N, Brichory F, Bourguet P, Le Pennec JP, Dazord L. Galectin-8: A complex sub-family of galectins (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 2001;8:245-250.
18. Cooper DN, Barondes SH. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology* 1999;9:979-984.
19. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005;5:29-41.
20. 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.
21. Ilarregui JM, Bianco GA, Toscano MA, Rabinovich GA. The coming of age of galectins as immunomodulatory agents: impact of these carbohydrate binding proteins in T cell physiology and chronic inflammatory disorders. *Ann Rheum Dis* 2005;64 (Suppl 4):96-103.
22. Rubinstein N, Ilarregui JM, Toscano MA, Rabinovich GA. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue Antigens* 2004;64:1-12.
23. Sturm A, Lensch M, Andre S, Kaltner H, Wiedenmann B, Rosewicz S, Dignass AU, Gabius HJ. Human galectin-2: novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation. *J Immunol* 2004;173:3825-3837.
24. Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim HR, Hogan V, Inohara H, Kagawa S, Raz A. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res* 2003;63:8302-8311.
25. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:6737-6742.
26. Nio J, Kon Y, Iwanaga T. Differential cellular expression of galectin family mRNAs in the epithelial cells of the mouse digestive tract. *J Histochem Cytochem* 2005;53:1323-1334.
27. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao WH, Rutgeerts P. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002;359:1541-1549.

28. Rutgeerts P, D'Haens G, Targan S, Vasiliauskas E, Hanauer SB, Present DH, Mayer L, Van Hogezaand RA, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, van Deventer SJ. Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999;117:761-769.
29. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005;353:2462-2476.
30. Rabinovich GA, Liu FT, Hirashima M, Anderson A. An emerging role for galectins in tuning the immune response: Lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scandinavian Journal of Immunology* 2007;66:143-158.
31. Dignass AU, Podolsky DK. Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. *Gastroenterology* 1993;105:1323-1332.
32. Dignass AU, Sturm A. Peptide growth factors in the intestine. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2001;13:763-770.
33. Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, Mencarelli A, Palazzetti B, Federici B, Rabinovich GA, Morelli A. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 2003;124:1381-1394.
34. Kashio Y, Nakamura K, Abedin MJ, Seki M, Nishi N, Yoshida N, Nakamura T, Hirashima M. Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. *J Immunol* 2003;170:3631-3636.
35. Lu LH, Nakagawa R, Kashio Y, Ito A, Shoji H, Nishi N, Hirashima M, Yamauchi A, Nakamura T. Characterization of galectin-9-induced death of Jurkat T cells. *J Biochem (Tokyo)* 2007;141:157-172.
36. Hokama A, Mizoguchi E, Sugimoto K, Shimomura Y, Tanaka Y, Yoshida M, Rietdijk ST, de Jong YP, Snapper SB, Terhorst C, Blumberg RS, Mizoguchi A. 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.
37. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, Schutz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schurmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000;6:583-588.
38. van Dieren JM, Kuipers EJ, Samsom JN, Nieuwenhuis EE, van der Woude CJ. Revisiting the immunomodulators tacrolimus, methotrexate, and mycophenolate

mofetil: their mechanisms of action and role in the treatment of IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:311-327.

39. Harjacek M, Diaz-Cano S, De Miguel M, Wolfe H, Maldonado CA, Rabinovich GA. Expression of galectins-1 and -3 correlates with defective mononuclear cell apoptosis in patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2001;28:1914-1922.
40. Fuss IJ, Becker C, Yang Z, Groden C, Hornung RL, Heller F, Neurath MF, Strober W, Mannon PJ. Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:9-15.
41. Mudter J, Neurath MF. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: Pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1016-1023.

Publikationsliste

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 Oct;14(10):1366-72.

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 Jul 9;3(7):e2629.

Paclik D, Berndt U, Guzy C, Dankof A, Danese S, Holzloehner P, Rosewicz S, Wiedenmann B, Wittig B, Dignass A, Sturm A.

Galectin-2 induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes and ameliorates acute and chronic experimental colitis in mice.

J Mol Med. 2008 Dec;86(12):1395-406.

Anhang

Abkürzungen

APC	Antigen präsentierende Zelle
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CRD	Kohlenhydrat-Erkennungsregion
DSS	Dextran Sodium Salt
Gal	Galektin
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon-gamma
LPMC	Lamina propria mononukleäre Zellen
LPT	Lamina propria T-Zellen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha