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

DISSERTATION

Subzelluläre Lokalisation von MICA in Abhängigkeit vom MICA-Genotyp bei Zöliakie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sarah Nadine Kamel

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.12.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung			
2	Einleitung	.13		
	21 Zöliakie	13		
	2.1 Enidemiologie	13		
	2.1.1 Epidemiologie	1/		
	2.1.2 Tatriogenese	17		
	2.1.3 Symptomatik	10		
	2.1.3.1 Komplikationen	20		
	2.1.4 Rompikationen	.20		
	2.1.5 Diagnostik	.22		
	2.1.6. Theranie	.24		
		.27		
	2.2 MICA	.25		
	2.2.1 Genetik	.26		
	2.2.2 Expression und Funktion von MICA in der Zöliakie	.29		
	2.3 Zielsetzung	.31		
~		~~		
3	Materialien, Methoden und Patientenkollektiv	.32		
	3.1 Materialien	.32		
	3.1.1 Materialien und Geräte	.32		
	3.1.2 Chemikalien	.33		
	3.1.3 Kits	.35		
	3.1.4 Puffer und Lösungen	.35		
	3.1.5 Software	.38		
	3.2 Methoden	.39		
	3.2.1 DNA-Sequenzierung	.39		
	3.2.1.1 Gewinnung der DNA	.40		
	3.2.1.2 DNA-Messung	.40		
	3.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	.40		
	3.2.1.4 Elektrophorese	.41		
	3.2.1.5 Reinigung der Amplifikate	.41		
	3.2.1.6 Sequenzierreaktion	.41		
	3.2.1.7 Reinigung der Produkte der Sequenzierreaktion	.42		
	3.2.1.8 Sequenzanalyse im ABI Prism 310 Genetic Analyzer	.42		
	3.2.2 Färbungen	.42		
	3.2.2.1 Herstellung der Kryoschnitte	.42		
	3.2.2.2 Kultivierung von Caco-2-Zellen	.43		
	3.2.2.3 Immunfluoreszenzfärbung	.43		
	3.2.2.4 Immunhistochemie	.45		
	3.2.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	.47		
	3.2.4 Auswertung der MICA/B-Intensität mit ImageJ (Intensity Plugin)	.49		
	3.2.5 Western-Blot-Methode	.49		
	3.2.5.1 Proteinextraktion	.50		
	3.2.5.2 Proteinquantifizierung	.51		
	3.2.5.3 Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	.51		
	3.2.5.4 Protein-Elektrotransfer	.51		

	3	.2.5.5	5 Immunodetektion	52
	3.3 3.3.	Patie 1	entenkollektiv Patienteninterviews	52 53
	3.4	Stati	istik	54
4	Erg	ebniss	se	55
	4.1	DNA	A-Sequenzierung	55
	4.2	Ausv	wertung der Patienteninterviews	57
	4.3	Korre	elation von Genetik und Klinik	59
	4.4	Korre	elation von Genetik und Histologie	61
	4.5 4.5.	Erge 1 ł	ebnisse der Western-Blot-Analysen Korrelation der membrangebundenen MICA-Level mit dem zyte MICA	62 osolischen 64
	4.6 4.6. 4.6.	Erge und (1 2	ebnisse der Färbungen zur subzellulären MICA/B-Lokalisation i Caco-2-Zellen MICA/B in Duodenalbiopsien MICA/B in Caco-2-Zellen	n Biopsien 66 66 76
5	Disł	kussic	on	82
	5.1	Häuf	figkeit des MICA-Allels A5.1	82
	5.2 5.2. 5.2.	Korre 1 2	elation der Genetik mit Klinik und Histologie der Patienten Korrelation von Genetik und Klinik Korrelation von Genetik und Histologie	82 82 83
	5.3	MICA	A/B-Proteinlevel	84
	5.4 5.4. 5.4.	Subz 1 2	zelluläre Lokalisation von MICA/B Membranfärbungen Intrazelluläre Marker	85 85 87
	5.5	Schl	ussfolgerung	89
6	Lite	raturv	verzeichnis	90
7	Anh	ang		95
	Eides	stattlic	che Versicherung	95
	Leben	slauf	-	97
	Publik	atione	en	97
Danks		sagun	ng	99

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Pathogenese der Zöliakie	S. 16
Abb. 2:	Duodenalschleimhaut eines Patienten mit unbehandelter	
	Zöliakie	S. 24
Abb. 3:	Ausschnitt aus der DNA-Sequenz des Exons 5 im MICA-Gen	S. 27
Abb. 4:	Funktionelle Domänen im MIC-A-Gen	S. 28
Abb. 5:	Fragebogen zur Evaluierung der klinischen Symptomatik	S. 53
Abb. 6:	Gel-Elektrophorese einer gereinigten DNA-Probe	S. 55
Abb. 7:	Auswertung der DNA-Sequenzierung bei drei Patienten	S. 56
Abb. 8:	Häufigkeit des MICA-Allels A5.1 bei CD, RCD und Kontrollen	S. 57
Abb. 9:	Auswertung der Patienteninterviews	S. 58
Abb. 10:	Klinische Präsentation von Patienten mit CD und RCD	
	abhängig von ihrer Genetik	S. 59
Abb. 11:	Immunfluoreszenz von MICA/B vs. Immunhistochemie von	
	MICA in Abhängigkeit vom MICA-Genotyp	S. 62
Abb. 12:	Proteinlevel von MIC/B im Western-Blot	S. 63
Abb. 13:	MICA/B-Banden bei drei Patienten mit unterschiedlichen	
	MIC-A-Genotypen	S. 64
Abb. 14:	MICA/B in Caco-2-Zellen	S. 64
Abb. 15:	Verteilung von MICA/B in Kontrollindividuen, Patienten	
	mit Zöliakie unter und ohne GFD und refraktärer Zöliakie	S. 65
Abb.16:	MICA/B im duodenalen Epithel von Patienten	
	mit Zöliakie, refraktärer Zöliakie und Kontrollen	S. 67
Abb. 17:	Intensitätsverteilung der MICA/B-Färbung	S. 68
Abb. 18:	Einzelanalysen der MICA/B-Intensität von vier Zellen	S. 68
Abb.19:	MICA/B versus AP bzw. ZO-1	S. 69
Abb. 20:	Detailaufnahme mit MICA/B versus AP	S. 70
Abb. 21:	MICA/B versus Claudin 4 bzw. E-Cadherin	S. 70
Abb. 22:	MICA/B in Gegenfärbung zu IgA und rab3b	S. 71
Abb. 23:	Detailaufnahme mit MICA/B versus rab3b bzw. IgA	S. 72
Abb. 24:	MICA/B in Gegenfärbung zu Caveolin, CD71 und Clathrin	S. 72

Abb. 25: MICA/B in Gegenfärbung zu Golgin, Hrs rab5, rab11		
	und Tubulin	S. 73
Abb. 26:	Gegenfärbung von MICA/B und Mucin-2	S. 74
Abb. 27:	Gegenfärbung von MICA/B und CD3	S. 75
Abb. 28:	MICB im duodenalen Epithel	S. 75
Abb. 29:	MICA/B in Caco2-Zellen	S. 76
Abb. 30:	MICA/B in Gegenfärbung zu ZO-1, alkalischer Phosphatase,	
	E-Cadherin und Lectin	S. 77
Abb. 31:	Darstellung von Aktin in Gegenfärbung zu MICA/B	S. 78
Abb. 32:	MICA/B gegenüber GM1	S. 78
Abb. 33:	MICA/B versus rab3b in Caco-2-Zellen	S. 79
Abb. 34:	MICA/B in Gegenfärbung zu Caveolin, CD71, Clathrin,	
	Golgin, Hrs, rab3b, rab5, rab11 und Tubulin	S. 80

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Übersicht über das Symptomspektrum der Zöliakie			
Tab. 2:	: Kennzeichen der refraktären Zöliakie			
Tab. 3:	Marsh-Kriterien zur histologischen Beurteilung			
	der duodenalen Läsion	S. 23		
Tab. 4	Antikörper und Marker für Immunfluoreszenz,			
	Immunhistochemie und Western-Blot	S. 46f		
Tab. 5:	Verteilung der MICA-Allel-5.1-homozygoten (5.1/5.1),			
	heterozygoten (5.1/x) und nicht-5.1-homozygoten (x/x)			
	Individuen bei RCD, CD und Kontrollen	S. 55		
Tab. 6:	Übersicht über die extraintestinalen Symptome			
	der 28 befragten Patienten	S. 57		
Tab. 7:	Darstellung der 28 Patienten mit CD oder RCD			
	in Abhängigkeit ihrer MICA-Allele	S. 59		
Tab. 8:	Klinische Charakteristika der untersuchten Patienten	S. 60		
Tab. 9:	Mittleres und medianes Erkrankungsalter der Patienten			
	mit CD und RCD in Abhängigkeit vom MICA-Genotyp	S. 61		
Tab. 10	Paarweise Testung der einzelnen Gruppen mittels T-Tests	S. 63		
Tab. 11	Mittelwerte der MICA/B-Level bei 43 kDa	S. 66		
Tab. 12	Übersicht über die Kolokalisationssstudien in			
	Duodenalbiopsien	S. 74		
Tab. 13	Übersicht über die Kolokalisationssstudien in Caco-2-Zellen	S. 81		

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
A5.1	Alanin 5.1
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zellen (englisch antigen presenting cells)
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
С	Cytosin
CD	Zöliakie (englisch <i>celiac disease</i>)
CD3	englisch cluster of determination 3
CTX-B	Choleratoxin-B
DAB	3,3'Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
EATL	Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycolbisaminoethylethertetraacetat
ESPGHAN	European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
et al.	und andere (lateinisch <i>et alii</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
GFD	glutenfreie Diät
GPI	Glykosylphosphatidylinsotol
HLA	Humanes Leukozytenantigen

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (englisch high performance			
	liquid chromatography)			
IEL	intraepitheliale Lymphozyten			
IFN-γ	Interferon-y			
lg	Immunglobulin			
IL-1	Interleukin-1			
Ko	Kontrollen			
m	Maus			
MØ	Makrophagen			
MEM	Minimal Essential Medium			
MHC	Histokompatibilitätskomplex (englisch major histocompatibility complex)			
MICA	(englisch major histocompatibility complex class I chain related protein A)			
MMP	Matrix-Metalloproteasen			
NK-Zellen	natürliche Killerzellen			
NKG2D	(englisch natural killer group 2, member D)			
OD	optische Dichte			
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese			
PCR	Polymerasekettenreaktion (englisch polymerase chain reaction)			
rb	Kaninchen (englisch <i>rabbit</i>)			
RCD	refraktäre Zöliakie (englisch refractory celiac disease)			
S.	siehe			
SDS	Natriumdodecylsulfat			
sMICA	lösliches (englisch <i>soluble</i>) MICA			
Т	Thymin			
Tab.	Tabelle			
TCR	T-Zell-Rezeptor (englisch t-cell receptor)			
TEMED	Tetramethylethylendiamin			
TNF-α	Tumornekrosefaktor-a			
Tris	Trishydroxymethylaminomethan			
tTG	Gewebstransglutaminase (englisch tissue transglutaminase)			
VS.	versus			
z.B.	zum Beispiel			

1 Zusammenfassung

Einleitung: Zöliakie ist eine systemische, durch Gluten ausgelöste Immunerkrankung, die sich mit einem Malabsorptionssyndrom, aber auch mit vielfältigen Symptomen in nahezu allen Organen manifestiert und mit einer Prävalenz von etwa 1 % in der kaukasischen Bevölkerung auftritt. MICA, ein atypisches MHC-Klasse-I-Molekül, spielt eine tragende Rolle in der Pathogenese der Zöliakie, indem es als Ligand für intraepitheliale Lymphozyten, die bei der Erkrankung vermehrt in das Dünndarmepithel einwandern, zur Zelllyse und damit zu der zöliakietypischen Zottenatrophie beiträgt. MICA-Allele. MICA-A.5.1-Allele. Einige zusammengefasst als tragen eine Guanininsertion, die in einer Trunkierung der Transmembrandomäne resultiert und in MDCK-Zellen zu einer Sortierung in die apikale anstatt in die basolaterale Membran führt.

<u>Methoden:</u> Zöliakiepatienten und Kontrollen wurden mittels DNA-Sequenzierung auf das Vorliegen der MICA-A5.1-Allele untersucht. Anhand von Patienteninterviews wurde die klinische Präsentation der Zöliakie analysiert und mit dem MICA-Genotyp korreliert. Die Lokalisation von MICA wurde in Duodenalbiopsien der sequenzierten Patienten spezifisch mit Immunhistochemie dargestellt.

Mit Immunfluoreszenzfärbungen an Biopsien und Caco-2-Zellen wurde die subzelluläre Lokalisation von MICA und MICB, einem nahezu sequenzhomologen Protein, untersucht.

In Western-Blot-Analysen wurden die MICA/B-Proteinlevel von Patienten mit Zöliakie und refraktärer Zöliakie sowie Kontrollen verglichen.

<u>Ergebnisse</u>: Bei Zöliakiepatienten liegt das Allel A5.1 signifikant häufiger vor als bei Kontrollen, immunhistochemisch zeigte sich bei A5.1-positiven Patienten eine Sortierung von MICA in die apikale Membran. Eine Auswirkung auf die klinische Präsentation der Zöliakie bestätigte sich nicht.

In Duodenalbiopsien fand sich bei allen Individuen ein apikales Immunfluoreszenzsignal von MICA *und* MICB unabhängig vom MICA-Genotyp, das mit alkalischer Phosphatase, rab3b-positiven Vesikeln und IgA enthaltenden Strukturen kolokalisiert. In MICA-Allel-A5.1-negativen Caco-2-Zellen zeigte sich ebenfalls eine apikale MICA/B-Fraktion, die mit alkalischer Phosphatase, aber auch mit *Lipid rafts* kolokalisiert.

Die intrazellulär vorliegende MICA/B-Fraktion konnte keinem untersuchten Zellkompartiment zugeordnet werden.

In Western-Blot-Analysen bestätigte sich eine gesteigerte Expression von MICA/B nur in Patienten mit refraktärer Zöliakie gegenüber Kontrollen. Unabhängig vom Genotyp zeigte sich eine kleinere, 38 anstatt 43 kDa große MICA/B-Fraktion.

<u>Schlussfolgerung:</u> Die MICA-A5.1-Allele scheinen bei Kontrollen und Patienten eine Sortierung von MICA in die apikale Membran ohne Auswirkung auf die klinische Präsentation der Zöliakie zu bewirken. Die jedoch in allen Gruppen beobachtete apikale Lokalisation von MICA und MICB und die Kolokalisation mit sekretorischen Strukturen und *Lipid rafts* deuten auf eine zusätzliche Funktion von MIC-Proteinen neben der Interaktion mit den intraepithelialen Lymphozyten hin. Die im Western-Blot beobachtete, vom Genotyp unabhängige 38 kDa große MICA/B-Fraktion ist möglicherweise ein Hinweis auf eine posttranslationale Prozessierung der Proteine.

Um diese Hypothesen zu untersuchen, wären als Gegenstand weiterer Studien funktionelle Analysen von MICA und MICB vonnöten, um z.B. eine luminale Sekretion näher beleuchten zu können.

Abstract

Introduction: Celiac disease is a systemic immune disease induced by gluten which causes a malabsorption syndrome, but also manifests with many symptoms in almost all organ systems. The prevalence is about 1 % in the Caucasian population. MICA, an atypical MHC class I molecule, plays an important role in disease pathogenesis by acting as a ligand for intraepithelial lymphocytes, which in celiac disease infiltrate small intestine epithelium leading to cell lysis and thereby causing villous atrophy typical of the disease. There are four MICA alleles, collectively, MICA A5.1 alleles, carrying a guanine insertion leading to a truncation of the protein within the transmembrane domain. In MDCK cell lines this results in sorting of MICA to the apical instead of the basolateral cellular membrane.

<u>Methods:</u> By DNA sequencing, celiac disease patients and healthy controls were tested for the presence of MICA A5.1 alleles. Patients were interviewed to analyze the disease's clinical presentation in each individual; the results were correlated with the respected MICA genotype. MICA localization in duodenal biopsies was shown by immunohistochemistry staining.

Subcellular localization of MICA and MICB, a protein almost homologue to MICA in structure and sequence, was analyzed in human duodenal biopsies and Caco-2 cell lines by immunofluorescence staining.

Western blot analysis was performed in celiac disease and refractory celiac disease patients and in controls to compare MICA/B protein levels.

<u>Results:</u> MICA alleles A5.1 are significantly higher in patients with celiac disease than in controls. Immunohistochemistry showed an apical sorting of MICA in patients carrying MICA A5.1. There was no indication that apical MIC-A does affect clinical presentation of the disease.

An apical immunofluorescence staining of MICA *and* MICB together was found in all human duodenal biopsy samples, in both MICA A5.1 positive and negative patients, and co-localized with alkaline phosphatase, rab3b-positive vesicles and IgA-containing structures. Furthermore, MICA A5.1 negative Caco-2-cells showed this apical staining

signal as well; in this case immunofluorescence revealed a co-localization of MICA/B not only with alkaline phosphatase, but with lipid rafts.

The cell compartment holding intracellular MICA/B could not be identified.

Western blot analysis showed higher expression levels of MICA/B in refractory celiac disease patients compared with controls only. An amount of MICA/B with a molecular weight of 38 kDa instead of 42 kDa was found in both MICA A5.1 positive and negative samples, regardless of MICA genotype.

Conclusion:

MICA A5.1 alleles appear to cause MICA shifting in the apical membrane without affecting clinical presentation in celiac disease.

Apical localization of MICA *and* MICB and their co-localization with secretory structures and lipid rafts observed in all samples indicate an additional function of MICA/B other than acting as a ligand only. The amount of 38 kDa-MICA/B might suggest posttranslational modification of MICA/B proteins. In order to test these hypotheses, further functional studies, for example luminal secretion of MICA/B, have to be performed.

2 Einleitung

2.1 Zöliakie

Zöliakie (von griechisch $\kappa_{01}\lambda_{1\alpha}$ = Bauchhöhle, Därme [1]), früher auch glutensensitive Enteropathie oder einheimische Sprue genannt, wird klassischerweise als eine chronische Erkrankung des Dünndarms definiert, bei der bei genetisch prädisponierten Personen eine fehlgeleitete Immunantwort auf in der Nahrung enthaltenes Gluten zu autoimmuner Zerstörung der Enterozyten mit daraus resultierender, zumindest teilweiser Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie des oberen Dünndarms führt und deren Symptomatik unter glutenfreier Diät (GFD) reversibel ist. Heute wird die Erkrankung jedoch zunehmend als systemische, durch Gluten ausgelöste Immunerkrankung verstanden, da das klinische Spektrum neben gastrointestinalen Symptomen und den zahlreichen Folgen der entstehenden Malabsorption vielfältige Manifestationen in nahezu allen Organen umfassen kann [2].

2.1.1 Epidemiologie

Die Prävalenz der Zöliakie liegt in Europa und Nordamerika derzeit bei etwa 1 %, wobei zwischen den einzelnen Ländern die Häufigkeit zum Teil erheblich variiert [3]: So wurde aktuell in einer großen europaweiten Erhebung in Finnland die Prävalenz mit 2.4 %, in Deutschland nur mit 0,3 % angegeben [4]. Studien in einigen Ländern in Nordafrika, Südamerika und dem Mittleren Osten zeigen eine Häufigkeit von 0,5-0,8 % der dortigen Bevölkerung. Die Inzidenz der Zöliakie scheint außerdem zuzunehmen, jedoch ist bislang unklar, inwieweit der Anstieg lediglich mit der verbesserten Diagnostik und einer höheren Aufmerksamkeit gegenüber der Erkrankung zusammenhängt, oder ob durch andere Faktoren eine tatsächliche Erhöhung der Erkrankungshäufigkeit zu verzeichnen ist [3].

Die Erkrankung betrifft Frauen etwa zweimal häufiger als Männer [5] und kann neben zwei Häufigkeitsgipfeln, im Säuglingsalter und im vierten Lebensjahrzehnt [6] in jedem Lebensalter auftreten, wobei mit steigendem Alter die Häufigkeit von Patienten mit oligosymptomatischem Verlauf zunimmt [7].

Ein gehäuftes Auftreten der Zöliakie ist zudem bei Patienten mit Down- oder Turner-Syndrom sowie beim angeborenen selektiven IgA-Mangel zu verzeichnen [8].

2.1.2 Pathogenese

Glutene (lateinisch gluten, Leim [9]) sind prolin- und glutaminreiche wasserunlösliche Klebereiweiße in Getreiden, vor allem Weizen, Roggen und Gerste, die aus einem Gemisch aus verschiedenen, für jede Getreidesorte spezifischen Peptiden bestehen. In Weizen sind dies als große Polymere vorliegende Glutenine mit hohem (650-800 Aminosäuren) oder niedrigem Molekulargewicht [10] und Gliadinmonomere (griechisch $\gamma\lambda i\alpha$, Leim [9]), die aus 250-300 Aminosäuren bestehen und neben ihrem Laufverhalten in der Elektrophorese in die schwefelreichen α -, β -, γ -, und die ω -Gliadine mit geringem Schwefelgehalt [10] unterteilt werden [11, 12]. Der hohe Prolinanteil der Glutene vermindert die enzymatische Degradierung die Peptidasen durch des Gastrointestinaltraktes, sodass auch längere und damit stärker immunogene Peptide erhalten bleiben.

In gesunden Individuen besteht eine immunologische Toleranz gegenüber den in hohen Dosen mit der Nahrung zugeführten Glutenen, die Entwicklung einer Glutenintoleranz ist als multifaktorielles Geschehen zu verstehen: Die Bedeutung der genetischen Faktoren für die Krankheitsentstehung zeigen die Konkordanzraten von etwa 80 % bei monozygoten gegenüber 11 % bei dizygoten Zwillingen [13]. Unter der Vielzahl an Genen, für die bei unterschiedlich starkem Einfluss auf die Pathogenese eine Assoziation mit der Zöliakie beschrieben wurde, ist der wohl bedeutendste genetische Faktor der bei fast allen Zöliakiepatienten vorliegende HLA-Typ (Humanes Leukozytenantigen), HLA-DQ2 (bei über 90 % der Patienten nachweisbar) oder HLA-DQ8. Dieser kann jedoch nur als Prädisposition für die Glutenunverträglichkeit zu verstehen sein, da über 25 % der kaukasischen Bevölkerung HLA-DQ2-positiv sind und lediglich ca. 4 % von ihnen eine Zöliakie entwickeln [14]. Es ist bisher nicht abschließend geklärt, welche Auslösefaktoren zu der Immunreaktion und damit zum Verlust der Toleranz gegen Glutenpeptide führen. Vermutet wird eine Auflockerung der epithelialen Barriere z.B. im Rahmen einer Infektion, durch die eine große Menge der Peptide, die normalerweise nur in geringer Anzahl in die Lamina propria mucosae des Dünndarms eintreten, in diese gelangt und so eine effektive Immunantwort auslösen

kann [12]. Zusätzlich sind abnorme Transzytoseprozesse beschrieben worden, durch die bestimmte Gliadinpeptide in die Lamina propria eingeschleust werden [15, 16].

An der komplexen Pathogenese der Zöliakie sind sowohl das adaptive Immunsystem als Initiator der Immunantwort durch spezifische Erkennung von Gliadinen und Aktivierung einer Immunreaktion als auch das angeborene im Sinne einer durch das Milieu getriggerten unspezifischen Zytolyse inflammatorische der intestinalen Epithelzellen, die zu der bei Zöliakie typischen Zottenatrophie führt, beteiligt. Gliadine (besonders α - und γ -) und Glutenine stimulieren CD4-positive (CD4: cluster of determination 4) T-Helfer-Zellen in der Lamina propria mucosae von Zöliakiepatienten. Der HLA-DQ-Typ ist dabei für die Entstehung der Erkrankung maßgeblich, denn über die HLA-DQ2- oder -DQ8-Moleküle werden Gliadinpeptide von antigenpräsentierenden Zellen (APC) den CD4-positiven T-Helfer-Zellen präsentiert [17]. Eine zentrale Funktion bei diesem Prozess hat die im Bürstensaum und subepithelial extrazellulär vorliegende Gewebstransglutaminase (tTG) inne, da sie Gliadinfragmente enzymatisch deamidiert, also Glutaminreste unter Abspaltung von Ammoniak in Glutamat überführt und damit die Bindung der Peptide an HLA-DQ stabilisiert [12].

Die auf diese Weise aktivierten T-Helfer-Zellen setzen proinflammatorische Zytokine, unter anderem Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) frei, die eine chronische Entzündung unterhalten und dazu führen, dass sowohl weitere T-Helfer-Zellen in die Lamina propria als auch zytotoxische T-Lymphozyten vermehrt in das intestinale Epithel einwandern [17]. Diese intraepithelialen Lymphozyten (IEL) binden dort über ihren Gut-Homing-Rezeptor CD103 ($\alpha_E\beta$ 7-Integrin) an das Adherens Junction-E-Cadherin. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, Protein dass die Adhäsionskomplexe als Ausdruck der gestörten epithelialen Barriere nicht mehr fest miteinander verknüpft sind, was die Bindung des Integrins an E-Cadherin erst ermöglicht [18]. Die Zytokine TNF- α und Interleukin-1 (IL-1) bewirken außerdem sowohl eine gesteigerte Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMP) als auch eine verminderte Produktion von Kollagen I in Makrophagen (MØ) und Fibroblasten der Lamina propria, was zu Auflockerung und Abbau der extrazellulären Matrix führt und damit zu der bei Zöliakiepatienten beobachteten mukosalen Architekturstörung beiträgt [19].

Auch in der gesunden Schleimhaut existieren IEL als Bestandteil des intestinalen mukosalen Immunsystems. Dies besteht sowohl aus den üblichen CD4- oder CD8-

positiven T-Zellen, die einen aus dem $\alpha\beta$ -Heterodimer aufgebauten T-Zell-Rezeptor (TCR) tragen und in Verbindung mit den peptidbindenden MHC-Molekülen für die spezifische Fremdantigenerkennung maßgeblich sind, als auch aus solchen T-Zellen, die den $\gamma\delta$ -TCR und kein CD8 oder CD4 exprimieren [20] und neben der Erkennung verschiedener Strukturen wie Hitzeschockproteine und Lipidantigene [21] vermutlich eine immunregulatorische Funktion haben [22]. Über einen weiteren Membrankomplex, den NKG2D-Rezeptor (englisch *natural killer group 2, member D*), können intraepitheliale Lymphozyten auch mit antigenunspezifischen Liganden, u.a. dem atypischen MHC-Molekül MICA (s. unten) als Bestandteil des angeborenen Immunsystems interagieren [23].



Abb. 1: Pathogenese der Zöliakie

In dieser Hinsicht bedeutsam ist die Tatsache, dass ein Gliadinfragment, das sogenannte 19-mer (p31-49), diesen Teil des angeborenen Immunsystems aktivieren kann, indem es die Produktion des ebenfalls proinflammotorisch wirkenden Zytokins IL-15 durch Makrophagen, dendritische und epitheliale Zellen induziert. Diesem Zytokin

kommt in der Pathogenese der Zöliakie eine besondere Bedeutung zu: Neben einer Aktivierung der CD4-positiven T-Zellen durch IL-15, das so die Achse des adaptiven Immunsystems weiter stimuliert [17], wird vermehrt MICA durch IL-15 auf den Enterozyten exprimiert [24]. Gleichzeitig fördert das auf der Zelloberfläche der Enterozyten gebundene IL-15 die Invasion weiterer T-Lymphozyten in das Epithel [25] und bewirkt eine gesteigerte Expression des NKG2D-Rezeptors auf den T-Lymphozyten, der MICA bindet und so die Lyse der MICA-tragenden intestinalen Epithelzellen induziert. Die MICA/NKG2D-induzierte Enterozyten-Zytolyse trägt vermutlich zu der Architekturstörung des oberen Dünndarms im Sinne der bei Zöliakiepatienten häufig vorliegenden Zottenatrophie mit kompensatorischer Kryptenhyperplasie bei [24, 26].

Über die Aktivierung der T-Helfer-Zellen wird zusätzlich eine spezifische humorale Immunantwort in B-Zellen ausgelöst, sodass im Serum von Zöliakiepatienten Antikörper gegen zwei Antigengruppen nachweisbar sind: Zum einen Immunglobuline (Ig) gegen Gliadine selbst, zum anderen Antikörper gegen die Gewebstransglutaminase, die möglicherweise verantwortlich für einige extraintestinale Manifestationen der Die Gewebstransglutaminase stellt das Hauptantigen Erkrankung sind. der sogenannten Anti-Endomysium-Antikörper dar [27], die zunächst nur unspezifisch als Immunglobuline gegen unter anderem im Affenösophagus vorkommende Antigene des retikulären Bindegewebes beschrieben wurden [28]. Neben dem Auftreten im Serum können auch in Dünndarmbiopsien von Zöliakiepatienten tTG-Immunglobuline nachgewiesen werden, die sich als subepitheliale IgA-Ablagerungen darstellen [29].

2.1.3 Symptomatik

Die Zöliakie kann ein buntes Spektrum an gastroenterologischen und extraintestinalen Symptomen verursachen. Der Großteil dieser Auffälligkeiten resultiert aus der drastischen Verringerung der absorbierenden Oberfläche des oberen Dünndarms; daneben treten aber auch Beschwerden sowie zusätzliche Erkrankungen auf, die nicht Teil des Malabsorptionssyndroms sind. Diese stellen entweder extraintestinale Manifestationen der fehlgeleiteten Immunantwort dar oder sind Autoimmunerkrankungen, die häufig mit Zöliakie assoziiert sind [8]. Zur ersten Gruppe gehört vor allem die Dermatitis herpetiformis Duhring, die vermutlich aufgrund der molekularen Ähnlichkeit der epidermalen mit der intestinalen Transglutaminase

entsteht: Die bei Patienten mit Zöliakie gegen dieses Enzym gebildeten Immunglobuline vom Typ A (IgA) lagern sich hier subepidermal ab und könnten so zu den für die IgA-Dermatitis typischen vesikulären Hauterscheinungen führen. Bislang gibt es jedoch keine eindeutige Evidenz, dass den bei Zöliakiepatienten beobachteten intestinal subepithelialen tTG-IgA-Ablagerungen sowie den im Serum auftretenden tTG-Antikörpern eine nennenswerte Rolle in der Pathogenese der Zöliakie zukommt, sodass es fraglich erscheint, ob die tTG-Immunglobuline hauptursächlich für die Entstehung der Dermatitis sind. In einigen Studien ergaben sich allerdings Hinweise, dass diese Antikörper Einfluss auf die Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit sowie auf die Barriere- und Transzytosemechanismen des Epithels haben [30, 31].

Einen Grund für die häufig im Zusammenhang mit Zöliakie auftretenden Autoimmunerkrankungen scheinen genetische Faktoren darzustellen, da bei Zöliakiepatienten beobachtete genetische Konstellationen auch prädisponierend für bestimmte andere Autoimmunerkrankungen sind. So konnten als Einflussfaktoren für den Diabetes mellitus Typ 1 und die Zöliakie ein ähnliches HLA-Muster sowie eine Assoziation verschiedener Gene für Interleukine und Moleküle der T-Zell-Signaltransduktion mit beiden Erkrankungen gefunden werden [32]. Welchen Einfluss weitere Faktoren wie eine systemisch gesteigerte Reaktivität des durch Gluten stimulierten Immunsystems bei Patienten mit Zöliakie auf das Auftreten zusätzlicher Autoimmunerkrankungen haben, ist bislang noch unklar.

Einen Überblick über das breite klinische Spektrum gibt Tabelle 1 [3, 8, 33-35].

Gastrointestinale Symptomatik	Malabsorptionsassoziierte Symptome
Voluminöse Stühle	Anämie (durch Eisen-, Vitamin-B12-
Diarrhoe	und Folsäuremangel)
Geblähtes Abdomen	Osteopenie
Bauchschmerzen	Tetanie
Gewichtsverlust	Polyneuropathie
Übelkeit, Erbrechen	Hinterstrangdegeneration
Laktoseintoleranz	Wachstumsretardierung, Kleinwuchs
	Pubertas tarda
Assoziierte Erkrankungen	Fatigue
lgA-Mangel	
Diabetes mellitus	Nicht-malabsorptionsassozilerte Symptome
M. Addison	Arthritiden
Kollagenosen	aphtöse Stomatitis
Rheumatoide Arthritis	Zahnschmelzhypoplasie
Vaskulitiden	Alopezie
Sjögren-Syndrom	rezidivierende Perikarditis
Autoimmunthyreoiditis	Transaminasenerhöhung
Autoimmungastritis	Steatosis hepatis
Autoimmunhepatitis	Infertilität
Primär biliäre Sklerose	erhöhte Frühgeburten- und Abortrate
Primär sklerosierende Cholangitis	Verhaltensänderungen
Dermatitis herpetiformis Duhring	Kopfschmerzen
Psoriasis	zerebelläre Ataxie
M. Behçet	Epilepsie
Dermatomyositis	Myopathien
Vitiligo	Myelopathien
Myasthenia gravis	
Affektive Erkrankungen	
Schizophrenie	
Chromosomenanomalien	

Tab. 1: Übersicht über das Symptomspektrum der Zöliakie

2.1.3.1 Klinische Verläufe

Die unterschiedliche Ausprägung der Symptomatik unter den Patienten hat zu einer Unterteilung in verschiedene, häufig schwer zu differenzierende Formen geführt.

Die klassische Form der Zöliakie ist vornehmlich durch die gastrointestinale Symptomatik geprägt. Hier fallen ein geblähtes Abdomen, Bauchschmerzen, voluminöse oft Stühle mit gleichzeitig erhöhter Stuhlfrequenz (> 3 x / d),Gewichtsabnahme und weitere Symptome der Malabsorption auf. Eine Zöliakie äußert sich in dieser 1953 erstmals beschriebenen Form meist bei Kindern, seltener im Beschwerden und Erwachsenenalter, in dem häufig die extraintestinalen oligosymptomatische Ausprägungen im Vordergrund stehen [8, 36].

Manifestiert sich die Erkrankung ohne die klassischen gastrointestinalen Symptome überwiegend extraintestinal, spricht man von einem <u>"atypischen", besser</u> <u>oligosymptomatischen Verlauf</u> der Zöliakie [36].

Liegen keine oder kaum klinische Symptome vor, kann dennoch eine manifeste, als <u>silent</u> bezeichnete Zöliakie vorliegen, wenn entsprechende Architekturveränderungen der Duodenalschleimhaut auftreten und die zöliakietypischen Antikörper nachweisbar sind.

Gelegentlich zeigen Patienten, die Jahre nach der Diagnose einer Zöliakie wieder glutenhaltige Kost zu sich nehmen, trotz dieser Reexposition mit Gluten kein Rezidiv der klinischen Symptomatik. Finden sich dann sowohl eine normale Serologie als auch in einer Kontrollbiopsie eine unauffällige duodenale Schleimhaut oder lediglich eine leicht erhöhte Anzahl an IEL, spricht man von einer <u>latenten Form</u> der Zöliakie. Diese kann auch rückblickend bei solchen Patienten festgestellt werden, bei denen nicht zuvor, sondern im weiteren Verlauf erst zöliakietypische Veränderungen der Mukosa festgestellt werden [8].

Individuen, die HLA-DQ2- oder DQ8-positiv sind und Antikörper gegen die intestinale Gewebstransglutaminase aufweisen können, jedoch eine normale duodenale Schleimhautarchitektur haben, werden als Patienten mit <u>potenzieller Zöliakie</u> bezeichnet, sofern klinische Symptome für die Erkrankung sprechen [8, 37].

2.1.4 Komplikationen

Eine strikte glutenfreie Ernährung führt bei den meisten Patienten mit Zöliakie zu kompletter Rückbildung aller Symptome. Etwa 3 % aller Patienten mit Zöliakie entwickeln allerdings eine refraktäre Zöliakie (RCD), sie zeigen trotz mindestens für ein Jahr konsequent eingehaltener Diät histologische, klinische und serologische Symptome. Diese Resistenz gegen die GFD kann entweder primär, also ohne dass je eine Symptomfreiheit bestand, oder sekundär nach einem Intervall erfolgreicher Diät eintreten [38]. Zusätzlich zu den Patienten mit nachgewiesener Zöliakie existieren Fälle mit nicht GFD-sensiblen Veränderungen der Mukosa, ohne dass klinisch oder serologisch eine Zöliakie nachgewiesen wurde. Diese Patienten werden zusammen mit der RCD unter dem Oberbegriff der refraktären Sprue subsumiert [39].

Die RCD wird nach histologisch-immunologischen Kriterien in zwei Typen unterteilt: Beiden Formen, RCD Typ 1 und Typ 2, ist die Persistenz der duodenalen

Architekturstörung im Sinne einer Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie mit einer erhöhten Anzahl an IEL gemeinsam, beim Typ 2 liegen zusätzlich Veränderungen bei mehr als 10-20 % dieser Lymphozyten vor [8, 38]. Diese sogenannten aberranten Lymphozyten entstehen durch die oligo- oder sogar monoklonale Vermehrung von IEL, die kein CD8 oder CD4 auf ihrer Oberfläche tragen. Zudem sind sie dadurch gekennzeichnet, dass das Heterodimer CD3 [38], das normalerweise Bestandteil des T-Zell-Rezeptor-Komplexes ist [40], nur noch zytosolisch, nicht aber auf deren Zelloberfläche nachweisbar ist. Monoklonale T-Zellen gehen aus einer einzigen T-Zelle hervor und unterscheiden sich hinsichtlich ihres variablen Bereichs des T-Zell-Rezeptors nicht. Als oligoklonal wird analog eine Population bezeichnet, die aus wenigen Zellen hervorgeht. Diese klonale Expansion ist für die Immunantwort auf ein Antigen bedeutend, da hier eine große Zahl an Zellen benötigt wird, deren TCR für genau dieses Antigen spezifisch sind [41]. Bei der RCD Typ 2 bzw. einer unbehandelten Zöliakie können sich auch außerhalb dieser adäguaten Immunantwort unter dauerhafter Stimulation durch proinflammatorische Zytokine vermehrt diese klonalen Zellen entwickeln. Wird in einer Duodenalbiopsie mittels Klonalitätsanalyse des TCR eine klonale abnorme Population nachgewiesen, kann dies bereits als kryptisches T-Zell-Lymphom eingestuft werden [38]. Der Anteil der aberranten T-Zellen an den IEL korreliert dabei negativ mit der Zahl der den $\gamma\delta$ -TCR tragenden T-Zellen im Epithel, was für eine regulatorische Funktion im intestinalen Immunsystem spricht [22]. Der rasche Übergang in ein manifestes Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom (EATL) sowie häufig wiederkehrende Infektionen bei Patienten mit RCD vom Typ 2 erklären die 5-Jahres-Überlebensrate von nur 58 %.

Die RCD Typ 1 hat unter adäquater Therapie einen deutlich besseren Verlauf mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 90-96 % und geht selten in den Typ 2 über [42-44]. Eine Übersicht über beide Formen gibt Tabelle 2 [38, 45].

Refraktäre Zöliakie Typ 1	Refraktäre Zöliakie Typ 2	
viele begleitende Autoimmunerkrankungen	meist zw. 50-60 J.	
Infektionen	schwere Malabsorption	
thromboembolische Komplikationen	Gewichtsverlust	
	Bauchschmerzen	
Aberrante IEL < 10 %	Diarrhö	
	Hautbeteiligung	
	sinusoidale Infektionen	
	Fieber	
	Aberrante IEL > 20 %	

Tab. 2: Kennzeichen der refraktären Zöliakie

Bei Patienten mit lange unbehandelter Zöliakie ist das Risiko für das Enteropathieassoziierte T-Zell-Lymphom (EATL) um etwa den Faktor 40 gegenüber gesunden Individuen erhöht. Zudem besteht für alle Zöliakiepatienten ein erhöhtes Risiko, an gastrointestinalen Karzinomen zu erkranken [8].

2.1.5 Diagnostik

Grundlage für die Diagnosestellung einer Zöliakie sind die 2012 revidierten Kriterien der European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) [46]. Die bis vor kurzem gültigen Kriterien von 1990 erforderten den Nachweis der zöliakietypischen Veränderungen der duodenalen Schleimhaut und eine vollständige Symptomfreiheit unter GFD, die Bestimmung der zöliakietypischen Immunglobuline im Serum wurde hier nur zur Diagnoseerhärtung, eine probatorische Glutenbelastung, unter der die Beschwerden erneut auftreten, zur Diagnosesicherung bei unklaren Fällen empfohlen [47]. Die kürzlich aktualisierten Kriterien der ESPGHAN räumen allerdings der Serologie einen größeren Stellenwert in der Zöliakie-Diagnostik ein [46].

Besteht ein klinischer Verdacht auf das Vorliegen einer Zöliakie, ist demnach folgendes Vorgehen empfohlen:

<u>1. Serologische Diagnostik:</u> Zunächst sollte der tTG-IgA-Titer mittels ELISA bestimmt werden. Gleichzeitig ist die Messung des Gesamt-IgA-Spiegels aufgrund der häufigen Assoziation der Zöliakie mit dem selektiven IgA-Mangel erforderlich. Bei IgA-Mangel sind die tTG-IgG-Spiegel zu bestimmen. Negative tTG-Ig-Titer machen das Vorliegen einer Zöliakie bei IgA-Mangel unwahrscheinlich.

Zur Diagnoseerhärtung kann der Immunfluoreszenztest auf Endomysium-Antikörper mit ebenfalls hoher Sensitivität und Spezifität durchgeführt werden, wohingegen die Titer der Anti-Gliadin-Antikörper aufgrund der geringen diagnostischen Aussagekraft bei Erwachsenen obsolet sind. Zur Diagnosesicherung insbesondere bei Kindern unter zwei Jahren können jedoch spezifische Tests auf Antikörper gegen deamidierte Gliadinpeptide hilfreich sein.

<u>2. Histologie:</u> Bei positiver serologischer Diagnostik sollte eine Ösophagogastroduodenoskopie mit Entnahme von duodenalen Biopsien durchgeführt werden [46]. Die histologische Beurteilung erfolgt nach den durch Oberhuber erweiterten Kriterien von Marsh (siehe Tab. 3) [48, 49]. In Einzelfällen kann nach den aktuellen ESPGHAN-Leitlinien auf die Biopsie verzichtet werden (bei Kindern mit hochpositiver Serologie inklusive Bestätigungstests, klinischer Besserung unter glutenfreier Diät und positivem genetischen Test) [46].

Marsh-Kriterien				
Marsh 0 normale Schleimhautarchitektur, < 40 IEL / 100 Enterozyten				
Marsh 1 normale Schleimhautarchitektur, > 40 IEL / 100 Enterozyten				
Marsh 2 Kryptenhyperplasie, > 40 IEL / 100 Enterozyten				
Marsh 3 Kryptenhyperplasie und Zottenatrophie, > 40 IEL / 100 Enterozyten				
3a	partiell			
3b	subtotal			
Зc	komplett			

Tab. 3: Marsh-Kriterien zur histologischen Beurteilung der duodenalen Läsion. Hayat et. al empfehlen einen Grenzwert von 25 IEL / 100 Enterozyten [50]. Dies wird auch in den aktuellen ESPGHAN-Kriterien beschrieben [46].



Abb. 2: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung einer Duodenalschleimhaut bei unbehandelter Zöliakie. Grün: mit E-Cadherin markierte Enterozyten; blau: Zellkerne. Zu beachten ist die ausgeprägte Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie.

3. Genetik:

Da die Zöliakie in über 90 % mit HLA-DQ2 assoziiert ist, kommt auch die Bestimmung des HLA-DQ-Status in Betracht, dient aber aufgrund des geringen positiv prädiktiven Wertes hauptsächlich dem Ausschluss einer Zöliakie, beispielsweise bei Marsh-I-Histologie und negativer Serologie [46].

2.1.5.1 Screening

Bei Menschen mit einem erhöhten Risiko für eine Zöliakie sollten bei Einwilligung Screening-Tests durchgeführt werden, auch wenn keine zöliakietypischen Symptome bestehen. Diese Gruppe umfasst Patienten mit Down-, Turner- und Williams-Syndrom, mit selektivem Ig-A-Mangel, Autoimmunerkrankungen der Leber und der Schilddrüse, mit Diabetes mellitus Typ 1 sowie bei Individuen, deren erstgradige Verwandte an einer Zöliakie erkrankt sind [46].

2.1.6 Therapie

Die Therapie der unkomplizierten Zöliakie besteht in einer strikten lebenslangen glutenfreien Diät. Zur Therapiekontrolle werden zumeist halbjährlich bis jährlich die tTG-Antikörpertiter reevaluiert, erneute Biopsien in der Regel nur bei fehlender Normalisierung oder ausbleibender klinischer Besserung entnommen [47]. Bei Patienten mit refraktärer Zöliakie ist die Behandlung deutlich schwieriger und sollte

nur in spezialisierten Zentren erfolgen. Es kommen Kortikosteroide und

Immunsuppressiva, beim Typ 2 eine Chemotherapie mit Cladribine oder sogar eine autologe Stammzelltransplantation in Betracht [38].

2.2 MICA

Das Protein MICA (englisch: major histocompatibility complex (MHC) class I chain related protein A) ist ein atypisches MHC-Klasse-I-Molekül. Klassische MHC-I-Moleküle sind Proteine, die auf der Zelloberfläche fast aller kernhaltigen Zellen ständig exprimiert prozessierte Antigene, nämlich Peptide aus werden. und ihrem regulären Proteinstoffwechsel den Immunzellen präsentieren. Durch eine Bindung an Rezeptoren zytotoxischer T-Zellen können beispielsweise tumorös entartete Zellen oder solche, die virales Fremdprotein produzieren, identifiziert und eliminiert werden [41]. Die ebenfalls auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 kodierten atypischen MHC-I-Moleküle MICA und MICB zeigen zwar partielle Aminosäuresequenzhomologien zu den typischen [51], weisen jedoch auch grundlegend andere Eigenschaften auf. MICA findet sich nicht auf allen kernhaltigen Zellen; es wird in den meisten Epithel- und Endothelzellen transkribiert [52, 53], aber normalerweise nur auf der Zelloberfläche des intestinalen Epithels [54], auf Endothelzellen und Fibroblasten [55] exprimiert. Unter normalen Bedingungen befindet sich der Hauptteil dennoch intrazellulär und nur in geringem Ausmaß membranös, bei "Zellstress" wird das Protein vermehrt in die Zellmembran eingebaut: So führt ein verändertes Zytokinmilieu bei einer Inflammation – autoimmun oder infektiös, z.B. durch eine Zytomegalievirus-Infektion induziert – [56], aber auch eine tumoröse Transformation [57] zu verstärkter Expression auf den veränderten Zellen. In vitro können die MICA-Level außerdem durch Hitzeschock gesteigert werden, da die Translationsinitiationssequenzen von MICA und MICB Promotor-Hitzeschock-Elemente enthalten [54, 58].

MICA dient selbst, ohne Peptidpräsentation [54], als Ligand für den NKG2D-Rezeptor. Dieser wird konstitutiv auf der Oberfläche von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und zytotoxischen CD8-positiven $\alpha\beta$ TCR-T-Zellen sowie auf den hauptsächlich intraepithelial intestinal vorkommenden [59] $\gamma\delta$ TCR-positiven T-Zellen exprimiert [60] und ist mit dem Adapterprotein DAP10 (DNAX-aktivierendes Protein, Molekülgewicht 10 kDa) assoziiert [61], über das die Signaltransduktion erfolgt. Die Bindung eines MICA-Monomers an ein NKG2D-Homodimer [62] mediiert die Lyse der MICA-tragenden Epithelzelle. Neben MICA und MICB existieren weitere strukturell verwandte Liganden

für den Rezeptor, ULBP1-4 (das Protein UL16 des Zytomegalievirus bindende Proteine), die unter ähnlichen Bedingungen exprimiert werden [63].

Der extrazelluläre Anteil des Proteins MICA gliedert sich ähnlich den klassischen MHC-I-Molekülen in drei Domänen (α 1-, α 2-, α 3-Kette), wobei α 1 und α 2 die Bindungsstelle für den NKG2D-Rezeptor bilden, ist aber im Gegensatz zu diesen nicht mit β 2-Mikroglobulin assoziiert [54].

MICA kann auch im Serum einiger Patienten mit Krebserkrankungen nachgewiesen werden. Dieses sogenannte lösliche (englisch *soluble*) MICA (sMICA) bindet freie NKG2D-Rezeptoren, woraufhin deren Expressionslevel auf T- und NK-Zellen herabgesetzt werden [64]. Auch in den Seren von Zöliakiepatienten findet sich sMICA, allerdings ohne die Zahl der NKG2D-Rezeptoren relevant zu vermindern [24].

2.2.1 Genetik

Der Genort 6p21.3 enthält drei Pseudogene (MICC, MICD, MICE) und zwei funktionelle Gene für MICA und MICB, wobei MICB mit seiner DNA-Sequenz zu 83 % homolog zu MICA ist [51] und auch – soweit bekannt – in seiner Funktion große Ähnlichkeit mit jenem aufweist [58].

Das MICA-Gen kodiert (ebenso das MICB-Gen) ein Membranprotein aus 383 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 43 kDa. Da es auf der Zelloberfläche normalerweise stark glykosyliert vorliegt, ergibt sich mit Kohlenhydratresten eine Proteingröße von 65 -75 kDa [54].

Es sind derzeit über 60 verschiedene MICA-Allele bekannt [65, 66]. In den sechs Exons des MICA-Gens besteht ein hoher Polymorphismus: hauptsächlich in den Exons 2, 3 und 4, den extrazellulären Domänen, aber auch im Exon 5, der Transmembrandomäne, mit einer variablen Anzahl von GCT-Repeats [67]. Diese kodieren Alanin, was zur subsumierenden Bezeichnung mehrerer verschiedener Allele nach der Anzahl der Alanine in dieser Region der Peptidkette geführt hat (MICA-Allele A(Alanin)4 sind alle Allele mit 4 Alaninen in diesem Bereich der Transmembrandomäne). Bisher sind die Allelgruppen A4, A5, A6, A7, A9 und A10 bekannt [68].

Während Polymorphismen in den Exonen 2 und 3 die NKG2D-Bindungsstelle betreffen, scheint eine Mutation im Exon 5 eine veränderte Lokalisation des Proteins MICA zur Folge zu haben: Bei den MICA-Allelen 008 (Varianten 00801 und 00802), 023 und 028

[65], die als MICA-A5.1-Allele zusammengefasst werden, führt eine Guanininsertion nach dem zweiten der hier insgesamt fünf GCT-Triplets in der Transmembrandomäne zu einer Verschiebung des Leserasters (s. Abb. 3) und dadurch zu einem verfrühten Stopp-Codon, sodass ein großer Anteil der Transmembrandomäne sowie die zytoplasmatische Domäne nicht translatiert werden (s. Abb. 4). Diese trunkierte Variante des Proteins zeigt im Western-Blot bei HeLa-Zellen, die das MICA-Allel 008 tragen, eine Molekülgröße von 38 kDa ohne Glykosylierung [57].

In mit MICA-A5.1-transfizierten MDCK-Zellen wurde im Vergleich zur Transfektion mit einem Allel ohne die gewisse Guanininsertion gezeigt, dass diese Mutation hier zu einem fehlgeleiteten Transport in die apikale anstatt der basolateralen Membran der Zellen führt. Ursächlich dafür scheint das Fehlen der zytoplasmatischen Domäne, die das entscheidende Motiv für die Sortierung nach basolateral enthalten könnte [69]. Auch für andere Proteine, z.B. den Transferrinrezeptor, spielt die zytoplasmatische Domäne eine Rolle in der Sortierung nach apikal [70-72]. Mithilfe von immunhistochemischen Färbungen von duodenalen Biopsien aus Zöliakiepatienten mit und ohne Homozygotie für das Allel A5.1 ließ sich jedoch bislang kein Unterschied in der Lokalisation der trunkierten MICA-Variante feststellen [24].

1. GTT GCT GCT GCT GCT (GCT GCT...) ATT TTT GTT A

2. GTT GCT GCT GGC TGC TGC TAT TTT TGT TA

Abb. 3: Ausschnitt aus der DNA-Sequenz des Exons 5 im MICA-Gen. 1.: MICA-Allele A4 bis A10 mit der entsprechenden Anzahl an GCT-Repeats, 2.: MICA-Allel A5.1 mit einer Guanin-Insertion als Frame-Shift-Mutation.

Ein A5.1-Allel, das Allel 008, tritt trotz einer eventuell aberranten Lokalisation in der kaukasischen Bevölkerung mit einer Häufigkeit von über 45 % Prozent auf [73], möglicherweise da es einen Vorteil für die Immunantwort auf das humane Zytomegalievirus bietet: Ein in infizierten Zellen gebildetes Membranprotein, UL142, bindet normalerweise MICA-Moleküle intrazellulär, verhindert die Expression auf deren Oberfläche und somit die Abtötung der Zelle. UL142 kann jedoch das trunkierte MICA nicht binden und die unspezifische Immunantwort bleibt unbeeinträchtigt [63].





Abb. 4 zeigt bei zwei MICA-Allelen (*001 (A4) und *008 (A5.1)) die resultierenden funktionellen Domänen des Proteins MICA und die Größe der jeweiligen Transmembrandomäne ohne und mit Trunkierung durch die Frame-Shift-Mutation. Die Transmembrandomänen wurden mithilfe einer Software, die einen Hydrophobizitätsplot nach Kyte und Doolittle erstellt, ermittelt. Dabei wird jeder Aminosäure ein Punktwert zwischen -4,6 (am stärksten hydrophil) und +4,6 (am stärksten hydrophob) zugewiesen und abhängig von den umgebenden Aminosäuren modifiziert. Eine Transmembrandomäne erfordert demnach eine Folge von rund 20 hydrophoben Aminosäuren, die über einem Punktewert von +1 liegen [74]. Abkürzungen: EC: Extrazellulärdomäne, LP: Leader Peptid, α_1 : α_1 -Domäne, TM: Transmembrandomäne, CP: zytoplasmatische Domäne. Die x-Achse benennt die Zahl der Aminosäuren des Proteins.

2.2.2 Expression und Funktion von MICA in der Zöliakie

Die Verteilung von MICA im intestinalen Epithel wurde von Hue et al. mittels Immunhistochemie und Flow-Zytometrie analysiert: In Kontrollen findet sich demnach ein überwiegend intrazelluläres Signal vornehmlich in den Zotten, bei Patienten mit Zöliakie ein signifikant höheres Level, wobei MICA hier diffus und vermehrt auf der Zelloberfläche vertreten ist. In Zöliakiepatienten unter glutenfreier Diät werden wieder mit Kontrollen vergleichbare Expressionslevel erreicht. Die gesteigerte MICA-Expression unter glutenhaltiger Kost erklärt sich durch den Effekt der Gliadinpeptide auf das intestinale Epithel via IL-15. Bei Patienten mit refraktärer Zöliakie ist das MICA-Signal jedoch am höchsten [24] – auch ohne die kontinuierliche Stimulation des Immunsystems durch Gliadine.

Wie in Kap. 2.1.2 beschrieben, spielt das Protein MICA eine tragende Rolle in der Pathogenese der Zöliakie. Die Bindung der NKG2D-Rezeptoren an MICA führt normalerweise als kostimulierendes Signal zur TCR-vermittelten Lyse der Epithelzellen, jedoch konnte eine Lyse allein über die Signaltransduktion des NKG2D/DAP10-Komplexes bei Patienten mit refraktärer Zöliakie vom Typ 2, also mit aberranten T-Zellen gezeigt werden [24, 26].

Um als Liganden für den NKG2D-Rezeptor der IEL zu fungieren, scheint es erforderlich, dass das Protein MICA in der basolateralen Membran lokalisiert ist. Befände sich jedoch bei Patienten, die homozygot für das MICA-Allel A5.1 sind, das resultierende verkürzte Protein analog zu den Ergebnissen in vitro nur in der apikalen Zellmembran [69], ließe das den Schluss zu, dass eine Lyse kostimuliert oder ausschließlich über den NKG2D-Weg nicht möglich sei. Inwieweit sich dieser Umstand auf den Grad der Zottenatrophie und die klinische Symptomatik im Sinne einer Zöliakie mit geringen gastrointestinalen Beschwerden auswirkt, ist derzeit noch nicht abschließend geklärt. Patienten mit Zöliakie tragen das Allel A5.1 im Gegensatz zu Gesunden signifikant häufiger [75-77], bei A5.1-homozygoten Individuen liegt gemäß einiger Studien tatsächlich häufiger eine oligosymptomatische, "atypische" Zöliakie [7, 77] vor, als additiver Effekt bei Vorliegen des HLA-Genotyps DR3/DQ [78] und möglicherweise abhängig vom Auftreten des TNF- α -Allels TNF-308A [79]. Der trunkierten MICA-Variante käme also eine "Schutzwirkung" für den Gastrointestinaltrakt zu. Dem gegenüber steht gemäß anderer Studien die Aussage, dass zwischen Patienten mit Zöliakie und gesunden Individuen kein signifikanter Unterschied in der Verteilung des

MICA-Genotyps vorliegt [24, 80] und in der immunhistochemischen Untersuchung keine unterschiedliche MICA-Lokalisation gefunden werden konnte [24].

In Studien mit HeLa- und mit MICA transfizierten Daudi-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit zur Lyse durch NKG2D-tragende Zellen im Kontakt mit Zelllinien, die eine trunkierte MICA-Variante exprimieren, vermindert ist [24, 81]. So wurden HeLa-Zellen, die nicht polarisiert sind, im Zytotoxizitätsassay durch aus Zöliakiepatienten gewonnene IEL-Zelllinien nur in geringem Maße über ein NKG2D/MICA-vermitteltes Signal lysiert [24]. Dies führt zu der Annahme, dass hier nicht nur eine veränderte Lokalisation, sondern auch eine andere Eigenschaft dieser MICA-Variante eine verminderte Bindungsfähigkeit des NKG2D-Rezeptors bewirken könnte. Mit einem solchen MICA-Gen transfizierte Daudi-Zellen, bei dem den A5.1-Allelen entsprechend das Codon für die Aminosäure an Position 331 durch ein Stopp-Codon ersetzt wurde, wurden im Vergleich zu den Zellen, die mit nicht-trunkiertem MICA transfiziert wurden, durch humane NK-Zellen deutlich weniger effizient lysiert. Als verantwortlich dafür wurde eine S-Azylierung der Cysteinreste an den Positionen 331 und 332 erwogen, die bei der trunkierten Form demnach fehlt [81].

Die genaue subzelluläre Lokalisation von MICA im duodenalen Epithel ist derzeit noch unklar. In transfizierten Daudi-Zellen wurde dessen Assoziation mit sogenannten *Lipid rafts* beschrieben [81]. Diese stellen cholesterol- und sphingolipidreiche Abschnitte der Zellmembran dar, die frei in der Membran beweglich sind und an der Signaltransduktion vieler in ihnen enthaltener Proteine und an der Polarisation der Zellen beteiligt sind [82].

2.3 Zielsetzung

(1) Der Einfluss des MICA-Allels A5.1 auf die klinische Ausprägung der Zöliakie ist bislang ungeklärt, die *in vitro* beobachtete Sortierung der MICA-A5.1-Variante nach apikal konnte *in vivo* durch Immunhistochemie noch nicht nachvollzogen werden.

In dieser Arbeit werden daher Patienten mit Zöliakie und refraktärer Zöliakie mittels DNA-Sequenzierung auf das Vorliegen des Allels-A5.1 untersucht und diese Ergebnisse sowohl mit der MICA-Lokalisation in Duodenalbiopsien als auch mit der klinischen Symptomatik der Patienten korreliert.

Da in der Literatur außerdem unterschiedliche Ergebnisse zur Häufigkeit des MICA-A5.1-Allels bei Zöliakiepatienten im Vergleich zu Kontrollindividuen vorliegen, soll durch die Sequenzierung von Kontrollen auch zu dieser Frage Stellung genommen werden. Zusätzlich soll überprüft werden, ob das Allel A5.1 bei Patienten mit refraktärer Zöliakie seltener auftritt als bei Patienten mit einer auf die GFD ansprechenden Zöliakie.

(2) Bei Patienten mit refraktärer Zöliakie und unbehandelter Zöliakie wurde bereits flusszytometrisch und immunhistochemisch eine verstärkte MICA-Expression nachgewiesen. Hier soll mittels Western-Blot-Analyse die Expression von MICA und MICB in Patienten mit unbehandelter und behandelter Zöliakie, refraktärer Zöliakie und bei Kontrollpatienten verglichen werden.

Zudem soll überprüft werden, ob das Vorliegen der trunkierten MICA-Variante aufgrund der verschiedenen Molekülgrößen (43 versus 38 kDa) mittels Western-Blot-Methode festgestellt werden kann, wie es für HeLa-Zellen bereits gezeigt werden konnte.

(3) An Daudi-Zellen wurde eine Assoziation von MICA mit *Lipid rafts* gezeigt. Hier soll die subzelluläre Verteilung von MICA und MICB in Duodenalbiopsien von Patienten mit Zöliakie und refraktärer Zöliakie im Vergleich zu Kontrollen sowie am Zellmodell untersucht werden. Dabei wird die membranöse und intrazelluläre MICA/B-Fraktion mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt und den das Protein enthaltenden Kompartimenten zugeordnet.

3 Materialien, Methoden und Patientenkollektiv

3.1 Materialien

3.1.1 Materialien und Geräte

Brutschrank Kelvitron T Dako Pen Deckgläser Elektrophorese-Filmpapier Elektrophorese Gel Imager Elektrophoresekammern MaxiWide Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml Filterpapier ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Heizblock Kryostat Leica CM 1900 Lumineszenzbild-Analysator LAS 1000 Magnetrührer Magnetrührstäbchen Mikroskop Zeiss LSM 510 META Mikrotiterplattenlesegerät Tecan Spectra Classic Mini-Protean 3 Elektrophoresesystem Mini-Trans-Blot-Zelle Multi-well-Platten Nano Drop Spectrophotometer ND 1000 Objektträger Ohmmeter

Petrischalen Pipetten Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl Poly Screen PVDF-Transfer Membran Heraeus, Deutschland DAKO, Dänemark Menzel-Glaeser, Deutschland Mitsubishi, Japan Intas, Deutschland G&P Kunststofftechnik, Deutschland Sarstaedt, Deutschland Schleicher & Schuell, Deutschland Applied Biosystems, USA Grant, Deutschland Leica Microsystems, Deutschland Fuji, Deutschland IKA Labortechnik, Deutschland Merck, Deutschland Carl Zeiss AG, Deutschland

Tecan, Deutschland Biorad, Deutschland Biorad, Deutschland Nalge Nunc International, Dänemark peqLab Biotechnologie, Deutschland Menzel-Glaeser, Deutschland D. Sorgenfrei, Institut für Klinische Physiologie, Deutschland Nalge Nunc International, Dänemark Eppendorf, Deutschland Eppendorf, Deutschland NEN-Life Sciences, Deutschland Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml Skalpelle Thermal Cycler 2720 C 1000 Thermal Cycler Vortex-Genie 2 Wasserbad Wippe WT12 Zentrifugen – Eppendorf Centrifuge 5415C

- Laboratory Medical Centrifuge 3000
- Mini Centrifuge
- Zentrifuge Avanti J25

Zentrifuge Z233MK
Zellkulturbank BSB 4A
Zellkulturfilter Millicell-PCF 0,4 µm
Zellkulturflaschen 10 ml, 50 ml

3.1.2 Chemikalien

Acrylamid Merck, Deutschland LE-Agarose Biozym, Deutschland Ammoniumpersulfat (APS) Sigma-Aldrich Co., USA Antikörper s. Tab. 4, S. 46f. BCA Protein Assay Reagenz A+B Pierce, USA AppliChem, Deutschland Bovines Serumalbumin (BSA) Borsäure Merck, Deutschland Bromphenolblau Merck, Deutschland 3,3'Diaminobenzidin (DAB) AppliChem, Deutschland 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Boehringer-Mannheim, Deutschland Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Merck, Deutschland Ethylenglycolbisaminoethylethertetraacetat (EGTA) Merck, Deutschland Ethanol J.T. Baker, Niederlande Fötales Kälberserum (FKS) Biochrom, Deutschland

Eppendorf, Deutschland Feather Safety Razor Co., Japan Applied Biosystems, USA Bio Rad, USA Scientific Industries, USA Haake, Deutschland Biometra, Deutschland

Eppendorf, Deutschland Lab4You, Deutschland Labnet International, USA Beckman, Deutschland Hermle, Deutschland Gelaire, Australien Millipore, Irland Beckton Dickinson Labware, USA

Ficoll

Filipin GeneRuler 50bp DNA Ladder Glycin Humanserum Methanol Methyl-β-Cyclodextrin 50 μM Minimal Essential Medium (MEM) plus Glutamax Natriumazid Natriumdodecylsulfat (SDS) Paraformaldehyd 16% Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) PBS^{+Ca/Mg}-Lösung **PBS-Tabletten** Performance Optimized Polymer 6 Penizillin/Streptomycin 100x Primer, 10 µM: MICA5F 5'CCT TTT TTT CAg ggA AAg TgC MICA5R 5'CCT TAC CAT CTC CAg AAA CTg C Pro Tags Mount Fluor Proteinstandard SDS-7B RPMI-1640 Agmedia Medium Streptavidinperoxidase Sucrose SYBR Gold Tetramethylethylendiamin (TEMED) Tissue-Tek Trishydroxymethylaminomethan (Tris) Base Tris-HCl 1 M, pH 8,8 Triton X-100 0,05 % Trypsin-EDTA Tween 20

Amersham Pharmacia Biotech AB, Schweden Sigma-Aldrich Co., USA Fermentas, Deutschland Serva, Deutschland Sigma-Aldrich Co., USA Merck, Deutschland Sigma-Aldrich Co., USA

GIBKO Invitrogen, USA Sigma-Aldrich Co., USA Sigma-Aldrich Co., USA Electron Micorscopy Sciences, USA

PAA Laboratories GmbH, Österreich Life Technologies, Deutschland Applied Biosystems, USA PAA Laboratories GmbH, Österreich TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Deutschland

Biocyc GmbH & Co. KG, Deutschland Sigma-Aldrich Co., USA Sigma Aldrich Co., USA Sigma-Aldrich Co., USA Serva, Deutschland Gibko Invitrogen, USA Life Technologies, Deutschland Sakura Finetek Europe, Niederlande Merck, Deutschland Serva, Deutschland Boehringer, Deutschland Gibko Invitrogen, USA Sigma-Aldrich Co., USA Wasser, HPLC-analysiertJ.T. Baker, Niederlande(HPLC: englisch high performance liquid chromatography)WasserstoffperoxidSigma-Aldrich Co., USAZiegen-SerumZymed, Deutschland

3.1.3 Kits

BigDye Terminator v1.1Applied Biosystems, USACycle Sequencing KitApplied Biosystems, USADAKO REAL Detection System K5001DAKO, DänemarkLumi-Light Western-Blotting KitRoche, DeutschlandNucleoSpin Gel and PCR Clean-upClontech, USAPCR-KitRapidozym, DeutschlandQiaAmp DNA Blood Mini Kit 50Qiagen, Niederlande

3.1.4 Puffer und Lösungen

Agarose-Gel (Elektrophorese)			
2 %	Agarose		
200 ml	1 x TBE Puffer		
Badelösung (GM1	-Inkubation)		
140 mM	Na⁺		
123.8 mM	CI⁻		
5.4 mM	K⁺		
1.2 mM	Ca ²⁺		
1.2 mM	Mg ²⁺		
2.4 mM	HPO4 ²⁻		
0.6 mM	$H2PO_4^-$		
21 mM	HCO ₃ ⁻		
10 mM	D-Glucose		
0.5 mM	β-Hydroxybutyrat		
2.5 mM	Glutamin		
10 mM	D-Mannose		

0,1 % BSA

Blockierungslösung (Immunfluoreszenzfärbung)							
	2,5 g	BSA					
	15 ml	6 % Ziegenserum	ad 250 ml PBS ^{+Ca/Mg}				
<u>Brom</u>	phenolblau-La	aufpuffer-Stammlösung (El	<u>ektrophorese)</u>				
	0,25 %	Bromphenolblau					
	15 %	Ficoll	ad 100 ml 1 x TBE				
<u>Brom</u>	phenolblau-La	aufpuffer-Gebrauchslösung	<u>(Elektrophorese)</u>				
	15 %	Ficoll					
	6 ml	Stammlösung	ad 80 ml 1 x TBE				
BSA-	Blockierungsr	eagenz (Western-Blot)					
	25 g	BSA					
	5 ml	2% Natriumazid	ad 500 ml PBS/Tween				
<u>Elektr</u>	rophoresepuff	er					
	100 ml	10 x Puffer Westcoast					
	10 ml	10 % SDS	ad 1 I Aqua bidest				
<u>Färbe</u>	elösung (Elekt	<u>rophorese)</u>					
	25 µl	SYBR Gold					
	600 ml	1x TBE Puffer					
<u>Gebra</u>	auchslösung (Proteinquantifizierung) je F	Probe				
	196 µl	Pierce BCA Protein Assa	y Reagenz A				
	4 µl	Pierce BCA Protein Assa	y Reagenz B				
<u>Gesa</u>	mtlysepuffer (Proteinisolierung)					
	10 mM	Tris-Cl pH 7,5					
	150 mM	NaCl					
	0,5 %	Triton X					
	0,1%	SDS					
	1 Tablette Complete Mini ohne EDTA / 10 ml Lysepuffer						
<u>5 x Laemmli Puffer (Western-Blot)</u>							
	0,32 M	Tris pH 6,8					
	44 %	Glyzerol					
	25 %	ss-Merkaptoethanol					
	12,5 %	SDS					
	0,001 %	Bromphenolblau					
Memb	<u>Membranlysepuffer (Proteinisolierung)</u>						
---------------	---	--------------------------------	--------------------------	--	--	--	--
	20 mM	Tris-CI pH 7,4					
	5 mM	MgCl ₂					
	1 mM	EDTA					
	0,6 mM	EGTA					
	1 Tablette Complete Mini ohne EDTA / 10 ml Lysepuffer						
Paraf	ormaldehyd-L	<u>ösung (1 %) (Fixierung)</u>					
	1 ml	Paraformaldehyd 16 %					
	15 ml	PBS ^{+Ca/Mg}					
PBS/	Tween (Weste	ern-Blot)					
	2 Tabl.	PBS					
	1 ml	Tween 20	ad 1 I Aqua bidest.				
PCR-	Mastermix (pr	<u>o Probe)</u>					
	13,8 μl	HPLC-H ₂ O					
	2 µl	10 x Bio Therm Puffer					
	1 μl	dNTP -Natriumsalzlösung 2 mM					
	1 μl	MgCl ₂ 50 mM					
	je 0,5 μl	Primer					
	0,2 μl	Bio Therm DNA-Polymer	ase				
Perm	eabilisierungs	lösung (Immunfluoreszenz	<u>rfärbung)</u>				
	0,5 %	Triton-X 100	in PBS ^{+Ca/Mg}				
<u>10 x F</u>	Puffer West (<u>Western-Blot)</u>					
	144 g	Glycin					
	30,4 g	Tris HCI	ad 1 I Aqua bidest				
<u>Samn</u>	<u>nelgel – Stam</u>	<u>mlösung (Western-Blot)</u>					
	85 ml	30 % Acrylamid					
	125 ml	0,5 M Tris pH 6,8	ad 500 ml Aqua bidest.				
<u>Samn</u>	Sammelgel (Western-Blot)						
	4,9 ml Sammelgel – Stammlösung						
	50 µl	10 % SDS					
	50 µl	APS					
	5 µl	TEMED					

<u>1 x T</u> E	BE Puffer pH	<u>8,0 (Elektrophorese)</u>	
	0,9 mol/l	Tris	
	0,9 mol/l	Borsäure	
	25 mmol/l	EDTA	ad 1 I Aqua bidest.
<u>10 x T</u>	BS (Western	-Blot, Immunhistochemie)	
	80 g	1,37 M NaCl	
	12,1 g	Tris Base	ad 1 I Aqua bidest.
TBS/	Tween (Weste	ern-Blot)	
	100 ml	10 x TBS	
	1 ml	Tween 20	ad 1 I Aqua bidest.
<u>Trans</u>	ferpuffer (We	<u>stern-Blot)</u>	
	100 ml	10 x Puffer West	
	100 ml	Methanol	ad 1 I Aqua bidest.
Trenn	<u>gel (12,5 %)</u>		
	8,2 ml	Acrylamid	
	4,7 ml	Aqua bidest.	
	7 ml	1 M Tris pH 8,8	
	200 µl	10 % SDS	
	200 µl	APS	
	10 µl	TEMED	
<u>Zellku</u>	Ilturvollmediui		
	500 ml	MEM+Glutamax	
	15 %	FKS	
	1 %	Penicillin/Streptomycin	

3.1.5 Software

ABI PRISM 310 Data Collection Software	Applied Biosystems, USA
ABI PRISM DNA Sequencing Analysis	
Software	Applied Biosystems, USA
Aida	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH,
	Deutschland
Kyte Doolittle Hydropathy Plot Tool	S. Johnson, R. McCord, L. Robinson,
	USA

ImageJ 1.40g LSM 510 Software V 3.2 SP2 ND-1000 V 3.5.2 Wayne Rasband, USA Carl Zeiss AG, Deutschland PeqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung dient der Entschlüsselung der Basenreihenfolge von DNA-Abschnitten. Zur Identifizierung von Patienten mit dem MICA-Allel A5.1 wurde diese Methode angewendet, da deren Auflösung eine einzelne Baseninsertion erfassen kann. Die Sequenzierung wurde modifiziert gemäß der von Sanger entwickelten Didesoxymethode bzw. Kettenabbruchsynthese [83] durchgeführt: Die Basen Adenosin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T), werden *in vivo* bei der Synthese genomischer DNA als Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) von der DNA-Polymerase verknüpft. Wird experimentell stattdessen ein Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) in die Nukleotidkette (Nukleotid = Base + Furan + Phosphat) eingebaut, kann aufgrund der nun fehlenden 3'-Hydroxygruppe kein weiteres dNTP mehr angefügt werden, und es kommt zum Kettenabbruch.

Die Nukleinsäuresynthese erfolgt *in vitro* nach dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (englisch *polymerase chain reaction*, PCR). DNA-Doppelstränge werden dabei zunächst bei einer Temperatur um 90°C zu Einzelsträngen aufgespalten (*Melting*, Denaturierung). Nach Absenken der Temperatur binden Primer, also Oligonukleotide, die den Startpunkt festlegen, ab dem der gewünschte Bereich abgelesen und kopiert werden soll, an den entsprechenden DNA-Einzelstrang (*Annealing*, Hybridisierung). Eine DNA-Polymerase synthetisiert dann, wenn die Temperatur auf deren Optimum eingestellt wurde, mithilfe der dNTPs die komplementäre Nukleotidkette (Elongation). Dieser aus Denaturierung, Hybridisierung und Elongation bestehende Zyklus wird über die Temperaturveränderungen reguliert und über einen vorgegebenen Zeitraum ständig wiederholt, sodass die gewünschte DNA-Sequenz entlang der ständig neu gebildeten Nukleotidketten schließlich in großen Mengen amplifiziert werden kann. Die dabei verwendete Polymerase muss hitzestabil sein (Taq-Polymerase), damit sie bei der Temperatur während der Melting-Phase funktionstüchtig bleibt.

Die Sequenzierreaktion erfolgt ebenso nach dem PCR-Prinzip, der DNA-Polymerase auch werden aber sowohl dNTP als die vier verschiedenen nun mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten ddNTP angeboten, sodass DNA-Abschnitte Länge synthetisiert werden, bis unterschiedlicher schließlich innerhalb des gewünschten Bereichs Seguenzen mit jeder möglichen Basenanzahl vorliegen.

Die Sequenzanalyse erfolgte vollautomatisch im ABI Prism 310 Genetic Analyzer durch Kapillarelektrophorese und Detektion sowie Interpretation der Ergebnisse mithilfe einer Software: Nach der Sequenzierreaktion im Cycler werden die Proben automatisch nacheinander in eine mit einem Polymer gefüllte Glaskapillare eingebracht, die mit der Kathode verbunden ist. Jede Probe fließt durch diese zur Anode am anderen Ende der Kapillare (elektrokinetische Injektion), wobei die verschieden langen Nukleotidketten elektrophoretisch aufgetrennt und hintereinander aufgereiht werden. Am hinteren Teil der Kapillare werden die fluoreszenzmarkierten ddNTPs durch einen Argonlaser exzitiert und die Emissionen von einer Kamera registriert. Die Software interpretiert die Lichtsignale und liefert eine graphische Darstellung mit Benennung der Basensequenz.

3.2.1.1 Gewinnung der DNA

Die für die Sequenzierung verwendete genomische DNA wurde aus mit EDTA versetztem Patientenblut gewonnen, das zur HLA-DQ-Typisierung zur Bestätigung bzw. zum Ausschluss der Verdachtsdiagnose Zöliakie entnommen worden war. Die DNA wurde im Routinelabor der Charité Campus Benjamin Franklin mit dem Qiagen DNA Blood Mini Kit isoliert.

3.2.1.2 DNA-Messung

Der DNA-Gehalt der gewonnenen Isolate wurde mit dem Nano Drop Spectrophotometer ND 1000 gemessen. Aus der Extinktion (optische Dichte, OD) der Lösung bei 260 nm lässt sich die Konzentration der enthaltenen doppelsträngigen (ds) DNA bestimmen $(OD_{260} = 1 \text{ entspricht 50 } \mu \text{g} / \text{ml dsDNA}).$

3.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für den Erfolg der Sequenzierreaktion ist es notwendig, zunächst mit Hilfe der PCR den Teil der DNA zu amplifizieren, dessen Sequenz entschlüsselt werden soll.

Zur Durchführung wurde zunächst ein Mastermix aus Desoxynukleotiden, Vorwärtsund Rückwärts-Primern (gemäß Ota et al. [84]) für die Elongationen am kodogenen und kodierenden Strang, der Taq-Polymerase und einem Puffer hergestellt. Die Gemische aus je 19 µl Mastermix und 1 µl DNA-Probe durchliefen anschließend im Cycler die Temperaturzyklen unter folgenden Bedingungen [84]:

Denaturierung	94°C	1 min, 1. Zyklus: 5 min
Hybridisierung	55°C	1 min
Elongation	72°C	2 min, letzter Zyklus: 10 min
Zyklen	35	

3.2.1.4 Elektrophorese

Zur Erfolgskontrolle der PCR wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt, mit deren Hilfe die Größe der entstandenen Amplifikate festgestellt werden kann. Bei dieser Methode wandert die auf das Gel aufgetragene, aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladene DNA entlang einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Je nach Anzahl der Basenpaare und Ladungen wandern diese in einem bestimmten Tempo im Gel, sodass nach einer definierten Zeit alle darin enthaltenen DNA-Teile eine gewisse Strecke zurückgelegt haben, die mit ihrer Größe genau korreliert.

Für die Durchführung der Elektrophorese wurde zunächst ein Agarose-Gel mit Taschen zur Bestückung mit den Proben hergestellt, in die jeweils 5 µl des PCR-Produktes und des Laufpuffers gegeben wurden, zusätzlich wurde mindestens eine mit 2,5 µl Markersubstanz für die Größenbestimmung bestückt. Schließlich wurden die Proben für 45 min bei 80 V und 120 mA elektrophoretisch aufgetrennt und danach für die fotografische Detektion mit SYBR-Gold-Lösung gefärbt. Die Elektrophorese wurde zunächst mit dem gesamten Reaktionsprodukt durchgeführt, sodass neben den Amplifikaten auch Primerdimere im Trenngel sichtbar wurden.

3.2.1.5 Reinigung der Amplifikate

Um die Amplifikate aus dem PCR-Produkt zu isolieren, wurde ein Reinigungsschritt mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit durchgeführt. Die gereinigten Amplifikate wurden zur Erfolgskontrolle erneut elektrophoretisch untersucht.

3.2.1.6 Sequenzierreaktion

Für die Durchführung der Sequenzierreaktion, bei der die verschieden langen Nukleinsäureketten mit den Abbruchnukleotiden synthetisiert werden, wurde das BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit verwendet. Dabei wurde jeweils 1 μ l der aufgereinigten Amplifikate mit 5 μ l HPLC-analysiertem Wasser, 2 μ l Primer, 1 μ l Puffer und 2 μ l Premix versetzt. Die Bedingungen im Cycler wurden folgendermaßen gewählt:

Denaturierung	96°C	10 s, 1. Zyklus: 1 min
Hybridisierung	50°C	5 s
Elongation	60°C	4 min
Zyklen	25	

3.2.1.7 Reinigung der Produkte der Sequenzierreaktion

Um die Produkte der Sequenzierreaktion zu reinigen, wurde die DNA mit Ethanol und EDTA gefällt und in einem Gemisch aus HPLC-analysiertem Wasser und Formamid resuspendiert.

3.2.1.8 Sequenzanalyse im ABI Prism 310 Genetic Analyzer

Für die anschließende Kapillarelektrophorese und Detektion im ABI Prism 310 Genetic Analyzer wurden die Proben, HPLC-analysiertes Wasser, Puffer, die Kapillare und das POP-6-Polymer im Gerät installiert. Durch Variation der Injektionszeit und damit der für die Elektrophorese verwendeten Nukleotidmenge kann die Ablesbarkeit der Basensequenz verbessert werden. In diesem Ansatz wurden 30 s gewählt. Die Kapillarelektrophorese wurde bei 50°C, 1 mA und 15 V durchgeführt.

Die ermittelten Sequenzen wurden in Hinblick auf die Guanininsertion im Exon 5 mithilfe der von Robinson et al. [65] veröffentlichten Basenreihenfolgen der MICA-Allele analysiert.

3.2.2 Färbungen

Zur Darstellung von verschiedenen Molekülen im Gewebe wurden Immunhistochemieund Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten von duodenalen Biopsien sowie Immunfluoreszenzfärbungen von Caco-2-Zellen durchgeführt.

3.2.2.1 Herstellung der Kryoschnitte

Die bei diagnostischen Ösophagogastroduodenoskopien in der Charité Campus Benjamin Franklin entnommenen duodenalen Biopsien wurden zunächst bei 21°C für 1 h in 1%igem Paraformaldehyd fixiert, anschließend in PBS^{+Ca/Mg} gewaschen und für jeweils 5 min zunächst in 25 mM Glycin, dann erneut in PBS^{+Ca/Mg} überführt. Anschließend wurden die Gewebeproben bei 4°C mit Sucroselösung (in PBS^{+Ca/Mg}) mit ansteigender Konzentration (10%ige, 20%ige für jeweils 1 h, 30%ige für 14-16 h) entwässert. Die so vorbehandelten Biopsien wurden mit flüssigem Stickstoff gefroren, in TissueTek eingebettet und bei -80°C gelagert. Mit dem Kryostaten wurden aus den Kryoblöcken 5 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt, die vor dem Färben bei -20°C auf Objektträgern für 12-24 h gefroren wurden.

3.2.2.2 Kultivierung von Caco-2-Zellen

Als Modell für das intestinale Epithel wurde die Zelllinie Caco-2 eingesetzt. Diese wächst, ursprünglich isoliert aus kolorektalen Adenokarzinomzellen, in Kultur als Monolayer, also auf der Unterlage anhaftend als einschichtiges Epithel. Zwischen der 6. und 35. Passage sind diese Zellen in ihren Eigenschaften den intestinalen Epithelzellen sehr ähnlich, danach verlieren sie die Fähigkeit, sich zu differenzieren [85]. Hier wurden Zellen der 7. - 16. Passage verwendet.

Die Caco-2-Zellen wurden bei 37°C und fünfprozentiger CO₂-Begasung in Zellkulturflaschen mit Vollmedium kultiviert, wobei das Medium dreimal wöchentlich erneuert und die Zellen alle sieben Tage passagiert wurden, indem sie zur Ablösung von der Unterlage trypsiniert und anschließend neu ausgesät wurden.

Um die *in vivo* vorhandene apikal-basale Kompartimentierung im Modell nachzustellen, wurden die Caco-2-Zellen auf transparenten Millicell-PCF-Zellkulturfiltern mit einer Porengröße von 0,4 µm ausgesät. Nach der Aussaat auf die Filter folgte eine weitere, 14-tägige Kultivierungsphase. Die Integrität der Monolayer wurde durch Messung des transepithelialen Widerstands (Rt in $\Omega \cdot cm^2$) kontrolliert. Man geht dabei davon aus, dass kultivierte Zellen, die auf Zellkulturfiltern einen Monolayer bilden, innerhalb eines bestimmten Widerstandsspektrums (bei den hier eingesetzten Caco-2-Zellen 200- $400 \ \Omega \cdot cm^2$) einen ausreichenden Konfluenzgrad erreicht haben und die Zellgrenzen und Tight Junctions weitgehend intakt sind [86]. Alle Versuche wurden am 14.-15. Tag nach der Aussaat durchgeführt.

3.2.2.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenz dient der genauen Darstellung von Strukturen in Geweben und Zellen. Dazu werden z.B. in Mäusen oder Kaninchen hergestellte Antikörper verwendet,

die die jeweiligen Proteine spezifisch binden. Danach werden in einer anderen Tierart (z.B. Ziege) produzierte fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper auf das Präparat gegeben, die spezifisch an die Fc-Region der Primärantikörper binden (indirekte Immunfluoreszenz). Die strukturspezifischen Antikörper können auch selbst an ein Fluophor gekoppelt werden (direkte Immunfluoreszenz). Werden in verschiedenen Tierarten produzierte Primärantikörper und farblich unterschiedlich markierte Sekundärantikörper bzw. direkt fluoreszenzmarkierte Stoffe verwendet, können zwei bis drei verschiedene Strukturen gleichzeitig angefärbt werden.

Für die Färbung der Kryoschnitte wurden diese zunächst auf dem Objektträger mit dem DAKO-Pen umrandet, mit PBS^{+Ca/Mg} gewaschen und anschließend mit Triton-X-Lösung 5 min lang bei 21°C permeabilisiert. Die darauf folgende einstündige Inkubation in Blockierungslösung bei Raumtemperatur verringert eine unspezifische Bindung der wurden zweiten Antikörper. Danach die Schnitte nacheinander mit den Primärantikörpern, dann mit den Sekundärantikörpern, keine direkt wenn fluoreszierenden Marker eingesetzt wurden, bei 37°C für jeweils 1 h inkubiert, wobei nach jeder Inkubation ein Waschschritt mit Blockierungslösung folgte. Tab. 4 zeigt eine Übersicht aller verwendeten Antikörper und Markersubstanzen inklusive der geeigneten Konzentration. Nach der Zellkernfärbung (s. unten) wurde zum Eindecken nach Spülen mit Aqua bidest und Ethanol Pro Tags Mount Fluor auf die Objektträger gegeben und ein Deckglas platziert.

Die auf den Filtern kultivierten Caco-2-Zellen wurden vor dem Färbevorgang mit 4°C kaltem PBS^{+Ca/Mg} gewaschen, mit 1%igem Paraformaldehyd 15 min lang bei Raumtemperatur fixiert und unter gleichen Bedingungen mit Triton-X-Lösung permeabilisiert. Nach Waschen und Inkubation mit Blockierlösung wurden die Filter aus deren Ringhalterungen ausgeschnitten und wie die Kryoschnitte gefärbt, um danach auf unbeschichtete Objektträger überführt und eingedeckt werden zu können.

Auf den Caco-2-Zellen wurden auch die fluoreszenzmarkierten Substanzen Phalloidin-Alexa-Fluor-594 und Lectin-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verwendet. Phalloidin bindet F-Aktin und wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen der Immunfluoreszenzfärbung angewendet. Lektine sind Kohlenhydrate bindende Proteine und können zur Darstellung der apikalen Zellmembran genutzt werden, indem sie, auf das apikale Kompartiment der noch intakten, nicht fixierten Zellen gegeben, die Glykoproteine und –lipide binden.

44

Zur Darstellung der *Lipid rafts* wurde zunächst das Gangliosid GM1 (10 μM in Badelösung mit BSA) nach 90-minütiger Vorinkubation der Zellen bei 37°C in der Badelösung ohne BSA von apikal für 30 min bei 37°C auf die Caco-2-Zellfilter gegeben, um die Assoziation der *Rafts* zu induzieren [87]. Um festzustellen, ob eine Desorganisation der *Lipid rafts* Einfluss auf die Lokalisation von MICA hat, wurde in zwei weiteren Ansätzen den Membranen durch Zugabe von Methyl-β-Cyclodextrin Cholesterol entzogen. Dieses zyklische Oligosaccharid, das mit Cholesterol lösliche Komplexe bildet, wurde für 30 min bei 37°C 20 μM in Badelösung mit BSA verdünnt von apikal und basal auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen wie üblich weiterbehandelt und mit MICA/B und fluoreszenzmarkiertem Choleratoxin-B (CTX-B), das als Pentamer fünf GM1-Moleküle bindet und vernetzt [87], gefärbt. Die Hälfte der mit Methyl-β-Cyclodextrin behandelten Zellfilter wurde zusätzlich mit Filipin, einem fluoreszierenden Makrolid, das Cholesterol bindet, markiert [88], um den Erfolg des Cholesterolentzugs nachzuweisen. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37°C (Filipin Stammlösung 125 μg/ml, in PBS^{+Ca/Mg} 1:8 verdünnt).

Alle Gewebeschnitte und Zellen (außer den mit Filipin gefärbten Caco-2-Zellen) wurden anschließend an die oben genannten Färbeschritte zur Markierung der Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt (10 min, 21°C) und danach in PBS+Ca/Mg gewaschen. Die dadurch im Fluoreszenzmikroskop erkennbare blaue Farbe der Nuklei entsteht direkt, ohne zusätzliche Kopplung an ein Fluophor, durch die Bindung von DAPI an DNA.

3.2.2.4 Immunhistochemie

Zur spezifischen Darstellung von MICA in duodenalen Biopsien wurde die Immunhistochemie eingesetzt, da bei dieser Methode die Möglichkeit besteht, schwache Färbesignale chemisch zu verstärken. Die Färbung wurde von Simone Spiekermann im Institut für Pathologie der Charité Campus Benjamin Franklin durchgeführt. Das Grundprinzip ist dem der Immunfluoreszenzfärbung ähnlich, wobei der Sekundärantikörper nicht an ein Fluophor, sondern ein Enzym gekoppelt ist, das durch Zugabe eines Substrates die Bildung eines Farbstoffes katalysiert. Zur Signalamplifikation und Verminderung einer unspezifischen Färbung des Hintergrundes kommen verschiedene Modifikationen zum Einsatz. Hier wurde die Streptavidin-Biotin-Methode angewendet, bei der der Sekundärantikörper nicht direkt enzymgekoppelt,

45

sondern an Biotin gebunden ist. In einem weiteren Schritt wird an eine Peroxidase gekoppeltes Streptavidin hinzugegeben, das das Biotin des Sekundärantikörpers bindet. Nach Zugabe des Chromogens 3,3'Diaminobenzidin (DAB) als Substrat für die Peroxidase entsteht mit Wasserstoffperoxid schließlich eine braune Färbung.

Kryoschnitte wurden für jeweils 30 min zunächst mit dem spezifischen MICA-Antikörper, danach mit dem Sekundärantikörper und schließlich mit der Streptavidinperoxidase inkubiert. Nach jeder Inkubation erfolgte ein Waschschritt mit TBS-Puffer. Zur Farbentwicklung wurde DAB in Wasserstoffperoxid enthaltendem Puffer für 4 min auf die Präparate gegeben, die anschließend für die Mikroskopie eingedeckt werden konnten. Die Auswertung der Färbung erfolgte mit Hilfe von Prof. Dr. med. Christoph Loddenkemper (Institut für Pathologie der Charité Campus Benjamin Franklin).

Antikörper	Markierte Struktur Konzentrat		Firma
m- α -Caveolin, monoklonal	Caveolae	1:100	BD Biosciences, USA
m- α -CD3, monoklonal	T-Lymphozyten	1:50	BD Biosciences, USA
m- α -CD71, monoklonal	Transferrinrezeptor	1:50	Santa Cruz Biotechnology,
			USA
m- α -Clathrin, monoklonal	Endozytosevesikel,	1:100	Santa Cruz Biotechnology,
	clathrin coated pits		USA
m- α -Claudin4, monoklonal	Tight Junctions	1:50	Invitrogen, USA
m- α -Claudin5, monoklonal	Tight Junctions	1:50	Invitrogen, USA
m- α -E-Cadherin,	Adhaerens Junctions	1:500	BD Biosciences, USA
monoklonal			
m- α -Golgin-97, monoklonal	Golgi-Apparat	1:200	Invitrogen, USA
m-α-Hrs-2, monoklonal späte Endosome		1:100	Alexis Biochemicals, USA
	multivesicular bodies		
m- α -intestinale alkalische	apikale Zellmembran	1:100	Sigma-Aldrich Co., USA
Phosphatase, monoklonal			
m- α -MICA, monoklonal	MICA	1:200 in RPMI-	Bamomab GmbH,
		Medium	Deutschland
m- α -MICA, monoklonal	MICA	1:50-1:200	R&D, USA
m- α -MICA, monoklonal	MICA	1:50-1:200	Santa Cruz Biotechnology,
			USA
rb-α-MICA/B, polyklonal MICA, MICB		1:100	Santa Cruz Biotechnology,
			USA
m- α -MICB, monoklonal	MICB	1:50	R&D, USA

Antikörper	Markierte Struktur	Konzentration	Firma
m-α-MUC-2, monoklonal	Becherzellen	1:200	Santa Cruz Biotechnology,
			USA
m- α -Occludin, monoklonal	Tight Junctions	1:100	Zymed, Deutschland
m- α -rab3b, monoklonal	Sekretorische Vesikel	1:50	Santa Cruz Biotechnology,
			USA
rb- α -rab5, polyklonal	frühe Endosomen	1:100	Sigma Aldrich Co., USA,
m- α -rab5, monoklonal			Santa Cruz Biotechnology,
			USA
m-α-rab 11, monoklonal	Recyclingendosomen	1:100	BD Biosciences, USA
m- α -Tubulin, monoklonal	Mikrotubuli	1:200	Sigma-Aldrich Co., USA
m- α -ZO-1, monoklonal	Tight Junctions	1:50	BD Biosciences, USA

Tab. 4a

Fluoreszenzmarkierte Substanzen	Markierte Struktur	Konzentration	Firma
Phalloidin-Alexa-Fluor-594	Aktin	1:100	Invitrogen, USA
α-IgA-Cy2	IgA	1:200	Sigma Aldrich Co., USA
Lectin-FITC	apikale Membran	1:200	Sigma Aldrich Co., USA
CTX-B	GM1	1:200	Invitrogen, USA
			Tab. 4
Sekundärantikörper	Bindung	Konzentration	Firma
Alexa Fluor 488 Ziege-α-m	Maus-Ig	1:500	Invitrogen, USA
Alexa Fluor 594 Ziege- α -m	Maus-Ig	1:500	Invitrogen, USA
Alexa Fluor 488 Ziege-α-rb	Kaninchen-Ig	1:500	Invitrogen, USA
Alexa Fluor 594 Ziege- α -rb	Kaninchen-Ig	1:500	Invitrogen, USA
Esel- α -m, biotinyliert	Maus- Ig	1:200 in Dianova, Deutschland	
		Humanserum	

Tab. 4 c

Tab. 4 a-c: Antikörper und Marker für Immunfluoreszenz, Immunhistochemie und Western-Blot. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Substanzen mit Blockierungslösung verdünnt. Abkürzungen: m: Maus, rb: Kaninchen, α: anti.

3.2.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Die fluoreszenzgefärbten Zellen und Gewebe wurden mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie am Zeiss LSM 510 META Mikroskop untersucht.

Die Konfokalmikroskopie ermöglicht eine tomographische Analyse der aufgelegten Präparate, da durch Variieren des Fokus Schnittbilder jeder Ebene des Objektes erzeugt werden können. Bei der konventionellen Lichtmikroskopie überlagern sich die Lichtstrahlen mehrerer Ebenen, sodass lediglich eine scharfe Abbildung der Gesamtdicke des Präparates, nicht aber die Fokussierung einzelner Ebenen möglich ist. Dieses Streulicht wird in einem konfokalen Lasermikroskop durch eine Lochblende und die Verwendung eines Lasers als punktförmige Lichtquelle so weit reduziert, dass einzelne Punkte einer Objektebene scharf abgebildet werden können. Ein größerer Bereich dieser Ebene wird dargestellt, indem der Laser jeden einzelnen Punkt des gewählten Ausschnitts in der XY-Ebene abtastet. Die auf diese Weise generierten optischen Signale werden von Photomultiplier-Detektoren in elektrische umgewandelt und können so von einem angeschlossenen Computer weiterverarbeitet werden. Die Bildqualität kann durch mehrfaches Scannen jedes Punktes und Mitteln der gewonnenen Farbwerte verbessert werden.

Folgen von Schnittbildern durch die gesamte Höhe des aufgelegten Präparates, sogenannte *Z-Stacks*, können durch Aufnahmen von mehreren, in definiertem Abstand aufeinander folgenden Ebenen entlang der Z-Achse erstellt werden. Im Anschluss sind dadurch auch dreidimensionale Rekonstruktionen möglich.

Mit dem Laser können nacheinander in drei Kanälen die verschiedenen Fluophore angeregt werden, indem das Präparat mit Licht einer bestimmten Wellenlänge exzitiert wird. Die gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe geben dadurch ihrerseits Licht in einem gewissen Spektrum ab; mit geeignet gewählten Farbteilern wird dabei von den Photodetektoren lediglich dessen maximale Emission erfasst, wodurch Überlagerungen zwischen den einzelnen Kanälen weitestgehend verhindert werden können. Auch bei der Färbung müssen die Fluophore so kombiniert werden, dass sich in ihrem abgestrahlten Farbspektrum möglichst stark unterscheiden.

Werden Bilder mit optimalen Bedingungen aufgenommen, also dergestalt, dass die maximal mögliche Farbintensität ohne Übersteuerung erreicht wird, kann eine sogenannte Kolokalisationsanalyse durchgeführt werden: Liegen angefärbte Bereiche zweier Kanäle direkt übereinander, kann bei minimal gewählter Schichtdicke davon ausgegangen werden, dass die markierten Strukturen im selben Kompartiment liegen.

Die mit dem Zeiss LSM 510 META Mikroskop mit Ölimmersionsobjektiven 40- und 63facher Vergrößerung aufgenommenen Bilder und Z-Stacks wurden mit der Zeiss LSM 510 Software und mit ImageJ ausgewertet.

48

3.2.4 Auswertung der MICA/B-Intensität mit ImageJ (Intensity Plugin)

Um die in der Immunfluoreszenz dargestellte Farbintensität der MICA/B-Färbung als Verteilung über die einzelnen Zellen aus Gewebskryoschnitten von duodenalen Biopsien zu objektivieren und graphisch darzustellen, wurde eine Auswertungsmethode mithilfe eines selbst entwickelten Plugins für das Programm ImageJ erarbeitet (technische Umsetzung von Dr. rer. nat. Tobias Lenz). Hierzu wurde jeweils eine Zelle im Längsschnitt anhand der mit einer E-Cadherin-Gegenfärbung sichtbar gemachten Zellgrenzen umrahmt und der apikale Pol, der im Schnitt deutlich erkennbar ist, festgelegt, wobei nur Zellen analysiert wurden, die gerade in der Längsachse angeschnitten waren. Die markierte Zelle wurde dann automatisch in acht gleich große Sektionen unterteilt. Innerhalb dieser einzelnen Bereiche wurden die jeweiligen mit Immunfluoreszenz Mittelwerte der und Konfokalmikroskop erstellten Farbintensitäten (0-255) der MICA/B-Färbung pro Pixel errechnet und pro Zelle in Prozent der Maximalintensität (255) angegeben. Die erhobenen Werte für jede Zelle konnten auf diese Weise vergleichbar gemacht und auch als Mittelwerte für mehrere Zellen angegeben werden, ohne dass die Länge jeder Zelle berücksichtigt werden musste.

Aus allen drei Patientengruppen (Zöliakie, refraktäre Zöliakie und Kontrollen) wurden nun Kryoschnitte von je vier Patienten mit MICA/B und E-Cadherin gefärbt und mit dem Konfokalmikroskop mehrere Bilder mit optimalen Einstellungen (maximal mögliche Farbintensität ohne Übersteuerung) aufgenommen. Aus den erstellten Bildern wurden 20 Zellen von jedem Patienten analysiert, sodass aus jeder Gruppe insgesamt 80 Zellen zur Ermittlung der mittleren Intensitätsverteilung des MICA/B-Kanals ausgewertet wurden.

3.2.5 Western-Blot-Methode

Durch Ösophagogastroduodenoskopie gewonnene humane duodenale Biopsien von Zöliakie- und Kontrollpatienten sowie Caco-2-Zellen wurden auch mit der Western-Blot-Methode analysiert. Sie dient dem Nachweis und der quantitativen Bestimmung von Proteinen in Geweben oder Lösungen. Dabei bezeichnet der eigentliche Western-Blot nur die Übertragung von Proteinen aus einem Elektrophoresegel auf eine Nylonmembran, wodurch deren spezifische Detektion möglich wird. Vor der Durchführung dieses Blotvorgangs müssen die Proteine daher isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Trennung erfolgt in Anlehnung an die Methode von Laemmli [89] durch die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE). Die Gelmatrix aus Acrylamid bildet mithilfe des Radikalbildners APS und des Katalysators Tetramethylethylendiamin (TEMED) lange Polymere. Das stark negativ geladene SDS im Gel lagert sich an die Proteine an und führt zu deren vollständiger Denaturierung und gleichmäßiger negativer Ladung, sodass die Wanderung ausschließlich von deren Molekülgröße, der angelegten Spannung und der Beschaffenheit des Gels abhängig ist. Die so aufgetrennten Proteine können spezifisch nur durch Antikörper nachgewiesen werden, die nicht im Gel binden können, weshalb die Proteine mit dem Blot-Verfahren elektrophoretisch auf eine Nylonmembran übertragen werden müssen. Der spezifische Nachweis der auf der Membran fixierten Proteine, die Immunodetektion, wird ähnlich der Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe primärer Antikörper, die das untersuchte Protein binden, und Enzym-konjugierter Sekundärantikörper durchgeführt. Das an den zweiten Antikörper gebundene Enzym, in diesem Fall eine Peroxidase, katalysiert in Anwesenheit des geeigneten Substrats eine Chemilumineszenzreaktion, also die Bildung von Produkten, die Licht im sichtbaren Spektrum emittieren. Dieses wird mithilfe eines Lumineszenzdetektors registriert. Mit einer geeigneten Software können davon ausgehend die Mengen der analysierten Proteine bestimmt und verglichen werden.

3.2.5.1 Proteinextraktion

Aus den endoskopisch entnommenen Biopsien wurde die membrangebundene Proteinfraktion extrahiert. Nach der Entnahme wurden die Biopsien in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Weiterbearbeitung bei -80°C gelagert. Für die Proteinisolierung wurde aus den Gewebeproben zunächst unter stetiger Kühlung eine Zellsuspension hergestellt, indem sie mit 1 ml Membranlysepuffer versetzt mechanisch zerkleinert und homogenisiert wurden. Die Auftrennung der Proben erfolgte durch zwei Zentrifugationsschritte: Der durch die erste Zentrifugation (5 min, 200x g, 4°C) entstandene Überstand wurde abgenommen und erneut für 30 min bei 43.000x g und 4°C zentrifugiert. Die so sedimentierte Membranproteinfraktion wurde mit Triton-X enthaltendem Lysepuffer resuspendiert. Der gewonnene Überstand wurde in einigen Versuchsreihen zur Bestimmung der zytosolischen Proteine verwendet. Anschließend erfolgten die Bestimmung des Proteingehalts der Proben und deren Lagerung bei -80°C.

50

Aus Caco-2-Zellen wurden sowohl die membranständigen als auch die zytosolischen Proteine extrahiert. Die auf Filtern kultivierten Zellen wurden zunächst in 4°C kaltem PBS gewaschen, danach mit jeweils 100 µl Gesamtlysepuffer versetzt, mit einem Kunststoffspatel vom Filter abgetragen und für 30 min auf Eis im Lysepuffer inkubiert. Anschließend erfolgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 18620x g. Der gewonnene Überstand enthält die Proteine aus Membran und Zytosol und wurde nach der Konzentrationsmessung bei -20°C gelagert.

3.2.5.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch mit Hilfe des Bicinchoninsäure- (BCA) Reagenz bestimmt, das mit in Anwesenheit von Proteinen reduzierten Kupferionen stabile Farbkomplexe ausbildet [90].

Je 10 µl der Proben, der Standardproteine mit bekannten Konzentrationen (0 mg BSA/ml, 0,2, 0,8 und 1,2) zur Erstellung einer Eichgeraden und des eingesetzten Lysepuffers als Leerwert wurden mit jeweils 190 µl der BCA-Gebrauchslösung versetzt, wobei alle Ansätze zweifach aufgetragen wurden. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C erfolgte die Extinktionsmessung bei 562 nm im Tecan Spectra Mikrotiterplatten-Photometer. Die Proteinkonzentrationen wurden automatisch aus den gemittelten Extinktionswerten der Proben abzüglich des Leerwertes mithilfe der Eichgeraden ermittelt.

3.2.5.3 Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Für die Bestimmung von MICA mithilfe der SDS-PAGE wird ein 12,5-prozentiges Trenngel benötigt. Auf dieses Gel wurde ein weiteres, das Sammelgel, mit Taschen zur Befüllung mit den Proben geschichtet. Die polymerisierten Gele wurden in eine mit Elektrophoresepuffer befüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und die Taschen mit 15 µl Protein-Puffer-Gemisch, bestehend aus einem 10 µg enthaltenden Volumenanteil der Probe, 3 µl Laemmli-Puffer und Lysepuffer bestückt. Ein Proteingrößenmarker wurde mitgeführt. Nach einer fünfminütigen Denaturierung bei 95°C wurde die Elektrophorese bei konstanter Spannung von 100 V für etwa 90 min durchgeführt.

3.2.5.4 Protein-Elektrotransfer

Für die elektrophoretische Übertragung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im Gel auf die Nylonmembran wurde das Tank-Blot-System verwendet. Dazu wurde die Membran zunächst für 5 min in absolutem Alkohol, danach zusammen mit zwei Schwämmen und zwei Filterpapieren für 15 min in Transferpuffer inkubiert. Das vom Sammelgel isolierte Trenngel wurde ebenfalls in Transferpuffer vorbereitet und anschließend zusammen mit der Membran zwischen zwei Kunststoffplatten, Schwämmen und Filterpapieren befestigt. Diese Konstruktion wurde unter gleichmäßiger Kühlung in die mit Transferpuffer befüllte Transfer-Apparatur eingebaut. Der Elektrotransfer erfolgte bei 100 V für 60 min.

3.2.5.5 Immunodetektion

Zur Vorbereitung der Immunodetektion wurde die Membran nach dem Elektrotransfer in PBS/Tween gespült, anschließend bei Raumtemperatur für 2 h in BSA-Blockierreagenz zur Verminderung unspezifischer Antigen-Antikörperreaktionen geschwenkt und danach für etwa 18 h bei 4°C in den mit Blockierreagenz im Verhältnis 1:1000 verdünnten Primärantikörper MICA/B gegeben. Nach einem Waschschritt in PBS/Tween und TBS/Tween erfolgte schließlich die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen-Ig; Verdünnung 1:10000 in BSA-Blockierreagenz) für 90 min bei Raumtemperatur und nach erneutem Waschen im Dunkeln für 5 min in Lumi-Light-Reagenz[®]. Die Detektion der Chemolumineszenz der durch die Peroxidase Substrate erfolgte Lumineszenz-Detektor LAS-1000. umgesetzten im Die Lumineszenzintensität wurde als LAU/mm² ausgegeben. Für die Auswertung der Daten wurde die AIDA-Software verwendet.

3.3 Patientenkollektiv

Zur Durchführung der Färbungen, der DNA-Sequenzierung und der Western-Blots wurden drei Patientengruppen ausgewählt. Zum einen <u>Patienten mit Zöliakie</u>, die nach folgenden Kriterien ausgesucht wurden: Zum Zeitpunkt der Biopsie lagen unter glutenhaltiger Kost sowohl klinische Symptome (s. Kapitel 2.1.3), als auch im Serum pathologisch erhöhte Werte für die zöliakietypischen Antikörper tTG-IgA oder tTG-IgG und Anti-Endomysium-IgA vor. Der durchgeführte HLA-DQ2-Test war positiv. Zudem stellte sich in der duodenalen Biopsie eine Zottenatrophie (≥ Marsh I) dar. Lediglich ein Patient zeigte einen Marsh-0-Typ, dieser wies jedoch einen positiven Antikörperstatus und malabsorptionsassoziierte Symptome auf, sodass er trotz histologisch unauffälligem Befund unter glutenhaltiger Kost eingeschlossen wurde. Für die Western-

Blot-Analysen wurden zusätzlich Patienten mit Zöliakie unter mindestens einem Jahr GFD und Regredienz aller Symptome ausgewählt. Die zweite Gruppe bildeten <u>Patienten mit refraktärer Zöliakie</u>, die definitionsgemäß trotz glutenfreier Diät für mehr als ein Jahr weiterhin klinische, serologische und histologische Symptome zeigten. Die dritte Gruppe beinhaltete <u>gesunde Kontrollindividuen</u>, die unter normaler, also glutenhaltiger Kost keine der für eine Zöliakie typischen Symptome aufwiesen, deren zöliakietypische Antikörper im Serum negativ getestet worden waren und bei denen außerdem in der Duodenalbiopsie unter glutenhaltiger Diät eine normale mukosale Architektur erkennbar war.

3.3.1 Patienteninterviews

Die Individuen der ersten und zweiten Gruppe wurden telefonisch nach den Beschwerden zum Zeitpunkt der Diagnose befragt, um zu evaluieren, ob eine klassische oder oligosymptomatische klinische Präsentation der Erkrankung vorlag. Die Daten wurden durch Durchsicht der Patientenakten vervollständigt.

Die schriftliche Einverständniserklärung zur Verwendung der erhobenen Daten für diese Studie liegt von allen Patienten vor.

Fragebogen
Jahr der Erstdiagnose der Zöliakie?
Symptomatik vor Beginn der GFD?
1. Durchfall? Stuhlfrequenz <3 oder >3?
2. Körpergewichtsverlust?
3. Blähgefühl? Uncharakteristische Oberbauchbeschwerden?
4. Anämie, Fatigue-Symptomatik, Müdigkeit?
5. Lactoseintoleranz?
6. Fremdorganassoziation:
a. Leberwerterhöhung?
b. Diabetes mellitus?
c. Schilddrüsenentzündung, Unterfunktion der Schilddrüse?
d. neurologische Symptomatik?
e. Osteopenie?
f. Andere Autoimmunerkrankungen?
g. Wenn a-e "ja", waren diese Symptome Zöliakiediagnose-führend?
Aktuell noch GFD? Symptomatik bei Diätfehlern?

Abb. 5: Fragebogen zur Evaluierung der klinischen Symptomatik

3.4 Statistik

Die durch die DNA-Sequenzierung ermittelte Häufigkeit des MICA-Allels A5.1 in den drei Patientengruppen wurde mithilfe des Chi-Quadrat-Tests statistisch bewertet. Da mehrere Hypothesen an einem Datensatz getestet wurden, erfolgte eine Anpassung des Signifikanzniveaus mittels Bonferroni-Korrektur.

Für die Korrelation der Ergebnisse der DNA-Sequenzierung und der klinischen Präsentation der Patientengruppen wurde aufgrund der geringen Gruppengrößen keine statistische Analyse durchgeführt.

Die Testung auf Signifikanz beim Vergleich der Mediane des Erkrankungsalters wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

Ergebnisse der Western-Blot-Analysen wurden pro Gruppe als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben, die Unterschiede zwischen den Gruppen mit der Varianzanalyse auf Signifikanz überprüft. Um die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen paarweise zu testen, wurden mehrfache T-Tests mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

Bei der Auswertung der MICA/B-Verteilung in duodenalen Biopsien mit der MICA/B-Intensitätskurve wurde der Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Ein p-Wert < 0,05 wurde bei allen Berechnungen (bei der Bewertung der Allelhäufigkeit und bei der mehrfachen Testung mit T-Tests in den Western-Blot-Analysen gemäß Bonferroni-Korrektur) als statistisch signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 DNA-Sequenzierung

Die variable GCT-Domäne der MICA-Sequenz im Exon 5 wurde mithilfe der DNA-Sequenzierung bei 24 Patienten mit Zöliakie (CD, englisch *celiac disease*), zehn mit refraktärer Zöliakie und bei 40 Kontrollpatienten (Ko) analysiert.

Die in der PCR hergestellten Amplifikate zeigten eine Größe knapp unter 200 bp und über 150 bp (s. Abb. 6).



Abb. 6: Gel-Elektrophorese einer gereinigten DNA-Probe (links) nach Durchführung der PCR im Vergleich zum Größenmarker (rechts)

Die ermittelten Sequenzen wurden auf Vorliegen des MICA-Allels A5.1 untersucht, um die MICA-A5.1-homozygoten (5.1/5.1), heterozygoten (5.1/x) und nicht-5.1-homozygoten (x/x) Individuen zu detektieren. Abb. 7 zeigt die ermittelten Daten von 3 Patienten.

In den verschiedenen Gruppen ergab sich demnach folgende Verteilung:

MICA- Allele	RCD n = 10		CD n = 24		Ko n = 40	
	n	(%)	N	(%)	n	(%)
5.1/5.1	3	(30,0)	7	(29,2)	4	(10,0)
5.1/x	5	(50,0)	15	(62,5)	22	(55,0)
x/x	2	(20,0)	2	(8,3)	14	(35,0)

Tab. 5: Verteilung der MICA-Allel-5.1-homozygoten (5.1/5.1), heterozygoten (5.1/x) und nicht-5.1-homozygoten (x/x) Individuen bei RS, CD und Kontrollen



Abb. 7: Auswertung der DNA-Sequenzierung bei drei Patienten: Oben: 5.1/x, Mitte: x/x, unten: 5.1/5.1

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Chi-Quadrattests, wobei aufgrund der mehrfachen Testung eine Bonferroni-Korrektur vorgenommen wurde, aus der sich ein neues Signifikanzniveau von p < 0,0125 ergab. Das MICA-Allel A5.1 kommt demnach bei Patienten mit Zöliakie signifikant (p = 0,012) häufiger vor als bei den Kontrollindividuen, bei Patienten mit CD und RCD versus Kontrollen ebenfalls signifikant häufiger mit p = 0,0096.

Der Unterschied der Allelfrequenz bei Patienten mit refraktärer Zöliakie versus CD bzw. Kontrollen ist nicht signifikant (p = 0,68 bzw. p = 0,155).



Abb. 8: Häufigkeit des MICA-Allels A5.1 bei CD, RCD und Kontrollen. Statistische Auswertung durch Chi-Quadrat-Tests, korrigierte Signifikanz: p < 0,0125 (*)

4.2 Auswertung der Patienteninterviews

Bei 28 der 34 Patienten, die auf das A5.1-Allel untersucht worden waren, konnten ausreichend klinische Daten erhoben werden, um eine Einteilung in die klassische bzw. nicht-klassische, oligosymptomatische Form der Zöliakie vornehmen zu können. 21 der 28 Patienten hatten zum Zeitpunkt der Diagnose eine Diarrhoe, nur sieben zeigten kaum gastrointestinale Symptome. Die Einstufung in klassische und oligosymptomatische Form der Zöliakie erfolgte unter Berücksichtigung der weiteren Symptome gemäß Abb. 9. Tab. 6 zeigt die Häufigkeit extraintestinaler Symptome bei allen Befragten.

Symptom	Betroffene Individuen (n)
Erhöhte Transaminasen	8
chronische Erschöpfung	11
Anämie	18
Schwindel	4
Osteopenie	6
Assoziierte	13
Autoimmunerkrankungen	

Tab. 6: Übersicht über die extraintestinalen Symptome der 28 befragten Patienten



Abb. 9: Auswertung der Patienteninterviews und Einteilung in klassische bzw. oligosymptomatische Zöliakie nach deren Symptomatik

4.3 Korrelation von Genetik und Klinik

Unter den acht Patienten, die für MICA-A5.1 homozygot sind, wurden lediglich zwei als oligosymptomatisch eingestuft, 75 % der A5.1-heterozygoten Patienten zeigten die klassische, überwiegend gastrointestinale Form:

Klinische	Klassisch			Oligosymptomatisch		
Form						
MICA-Allel	5.1/5.1	5.1/x	x/x	5.1/5.1	5.1/x	x/x
Anzahl der Individuen	6	12	3	2	4	1

Tab. 7: Darstellung der 28 Patienten mit CD oder RCD in Abhängigkeit ihrer MICA-Allele



Abb. 10: Klinische Präsentation von Patienten mit CD und RCD abhängig von ihrer Genetik

Aufgrund der geringen Gruppengrößen wurde auf eine statistische Analyse verzichtet. Es zeigt sich jedoch die Tendenz, dass der MICA-Genotyp keinen Einfluss auf die Ausprägung gastrointestinaler Symptome hat. In Tab. 8 sind alle Patienten mit MICA-Genotyp, klinischer Symptomatik und duodenaler Histologie aufgeführt.

Patient	Alter	Zeit seit Diagnose- stellung (a)	MICA-Allele	CD/RCD	Marsh-Klassi- fikation	Diarrhoe	Gewichts- verlust	Blähgefühl/ Oberbauch- beschwerden	Anämie	Lactose- intoleranz	Fremdorgan- assoziation
1	59	13	5.1/5.1	CD	Illa	+	-	+	+	-	+
2	49	21	5.1/5.1	RCD	Illa	+	+	+	+	+	+
3	63	18	5.1/5.1	CD	1	+	+	+	+	+	+
4	69	31	x/x	RCD	IIIb	+	+	-	-	-	-
5	77	11	5.1/x	CD	Illa	+	+	-	+	+	+
6	73	22	5.1/5.1	RCD	IIIb	+	+	+	+	-	+
7	33	7	5.1/5.1	CD	Illa	+	-	+	-	+	-
8	72	5	5.1/5.1	CD	IIIb	+	+	+	+	-	-
9	31	30	5.1/x	CD	IIIb	+	+	-	-	+	-
10	36	4	5.1/x	CD	Illa	+	+	+	+	+	+
11	69	7	5.1/x	CD	I	-	-	+	+	-	+
12	69	15	5.1/x	CD	Illa	-	-	+	-	-	-
13	31	15	5.1/x	CD	Illa	+	+	-	-	-	+
14	60	11	5.1/x	RCD	IIIb	+	+	+	+	-	+
15	70	5	5.1/5.1	RCD	Illa	-	-	+	+	-	+
16	41	7	5.1/x	CD	IIIb	+	-	-	+	+	-
17	26	3	5.1/5.1	CD	0	-	-	+	-	-	-
18	78	3	x/x	CD	Illa	-	+	+	-	-	-
19	56	23	5.1/x	CD	Illa	+	+	+	+	+	+
20	52	7	5.1/x	CD	IIIb	+	+	+	+	-	+
21	79	16	5.1/x	RCD	Illa	+	+	-	+	-	-
22	34	?	5.1/x	CD	II	-	-	+	-	-	+
23	66	6	5.1/x	CD	III	+	+	+	-	-	+
24	71	7	5.1/x	CD	IIIb	+	+	+	+	-	+
24	55	10	5.1/x	CD	IIIb	-	+	+	-	-	-
26	Ŷ	>20, seit 1982	x/x	RCD	IIIb	+	+	+	+	-	+
27	32	?	x/x	CD	IIIc	+	-	+	+	-	+
28	38	?	5.1/x	CD	IIIc	+	+	+	+	-	-

Tab. 8: Klinische Charakteristika der untersuchten Patienten. Helle Färbung steht für klassische Zöliakie, dunkle für den oligosymptomatischen Typ.

Um zu klären, ob das MICA-Allel A5.1 möglicherweise nicht die Symptomatik, sondern nur das Erkrankungsalter beeinflusst, also zum Auftreten einer Zöliakie in späterem Alter führt, wurde das durchschnittliche Erkrankungsalter der MICA-A5.1-homo- und heterozygoten Patienten mit dem der Individuen ohne das Allel A5.1 verglichen (s. Tab. 9).

MICA-Allele	Mittleres Erkrankungsalter (a)	Medianes Erkrankungsalter (a)	Anzahl (n)
5.1/5.1	43,9	45,5	8
5.1/x	44,6	47	14
x/x	50	47,5	4

Tab. 9: Mittleres und medianes Erkrankungsalter der Patienten mit CD und RCD in Abhängigkeit vom MICA-Genotyp

Um die Mediane der drei Gruppen auf statistisch signifikante Unterschiede zu testen, wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. In den drei Gruppen konnten mit p=0,89 keine signifikanten Unterschiede im Erkrankungsalter festgestellt werden, auf eine Einzeltestung der einzelnen Gruppen wurde demnach verzichtet.

4.4 Korrelation von Genetik und Histologie

MICA wurde in Kryoschnitten aus duodenalen Biopsien von Patienten mit bekanntem MICA-Genotyp dargestellt. Durch Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen MICA, der aber aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu MICB auch dieses Protein markieren kann, ließ sich kein deutlicher Unterschied in der Verteilung bei verschiedenen MICA-Genotypen feststellen. Hier zeigte sich in allen Gruppen eine deutlich apikale Färbung (s. Abb. 11 oben).



Abb. 11: Oben: MICA/B (Immunfluoreszenzfärbung, rot: MICA, blau: Nuclei), unten: Immunhistochemische Darstellung von MICA. Drei Patienten mit ähnlicher Klinik, aber unterschiedlichem MICA-Genotyp.

Um MICA isoliert darzustellen, wurde ein spezifischer MICA-Antikörper (Bamomab, Deutschland) bei n = 5 Patienten mit dem Genotyp 5.1/5.1, n = 3 mit dem Typ 5.1/x und n = 2 mit dem Typ x/x eingesetzt und dessen Bindung immunhistochemisch visualisiert. In Etablierungsversuchen für die Immunfluoreszenz konnte mit drei verschiedenen spezifischen MICA-Antikörpern kein aussagekräftiges Signal erzeugt werden. Eine mögliche Ursache dieses methodischen Problems ist die starke Glykosylierung des Proteins.

Der Hauptanteil des immunhistochemisch generierten MICA-Signals (s. Abb. 11 unten) fand sich abhängig vom MICA-A5.1-Genotyp basolateral (x/x), apikal (5.1/5.1) bzw. apikal und basolateral (5.1/x).

4.5 Ergebnisse der Western-Blot-Analysen

Mithilfe der Western-Blot-Methode wurde die Menge an MICA und MICB in duodenalen Biopsien von jeweils 4 Patienten mit Zöliakie ohne und unter glutenfreier Diät, Patienten mit refraktärer Zöliakie und von Kontrollindividuen bestimmt. Western-Blot-Analysen konnten auch nach zahlreichen Etablierungsversuchen mit einem spezifischen MIC-Antikörper nicht aussagekräftig durchgeführt werden, sodass nur mit dem Antikörper gegen MICA/B gearbeitet werden konnte.

MICA/B kam dabei bei allen Patienten bei 43 kDa, bei einigen auch bei 38 kDa zur Darstellung.

Der Vergleich der Proteinlevel der vier Gruppen ergab folgende Verteilung (s. Abb. 13): Patienten mit refraktärer Zöliakie enthielten die höchsten Level an MICA/B. Patienten mit Zöliakie unter GFD zeigten eine höhere MICA/B-Expression als Patienten mit Zöliakie ohne Diät, wobei Kontrollen ähnliche Proteinlevel aufwiesen.



Abb. 12: Proteinlevel von MICA/B in Patienten mit refraktärer Zöliakie (RCD), Zöliakie unter (GFD) und ohne GFD (CD) und Kontrollindividuen (Ko)

Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse. Die vier Gruppen unterscheiden sich mit p = 0,0026 signifikant voneinander, das heißt, die MICA/B-Level sind in den Gruppen verschieden. In der paarweisen Testung der einzelnen Gruppen mittels T-Test und Bonferroni-Korrektur ergaben sich folgende Werte:

Gruppe	Ko vs. CD	CD vs. GFD	Ko vs. RCD	RCD vs. CD
р	0,7462	0,0417	0,0098 *	0,0129

Tab. 10: Paarweise Testung der einzelnen Gruppen mittels T-Tests.

Mit dem korrigierten Signifikanzniveau von p < 0,0125 zeigt sich, dass ein signifikanter Unterschied der Proteinlevel nur zwischen refraktärer Zöliakie und Kontrollen besteht. Patienten mit dem Genotyp 5.1/5.1 oder 5.1/x zeigten keine 38-kDa-Bande. Unter den sequenzierten Patienten trat diese Bande nur bei einem Patienten auf, der kein A5.1-Allel trägt. In zehn der n = 16 Patienten, deren Proben für die Western-Blot-Analyse verwendet wurden, konnte der MICA-Genotyp bestimmt werden. Acht dieser zehn hatten den Genotyp 5.1/x. Bei keinem dieser Patienten fand sich die 38-kDa-Bande. Jeweils ein Patient mit dem Typ 5.1/5.1 bzw. 5.1/x konnte identifiziert werden. Insgesamt fand sich bei 4 Patientenproben eine Bande bei 38 kDa.



Abb. 13: MICA/B-Banden bei drei Patienten mit unterschiedlichen MIC-A-Genotypen

In Caco-2-Zellen lag die mit dem MICA/B-Antikörper markierte Proteinbande ausschließlich bei 43 kDa.



Abb. 14: MICA/B in Caco-2-Zellen

4.5.1 Korrelation der membrangebundenen MICA-Level mit dem zytosolischen MICA

Um festzustellen, ob in den einzelnen Gruppen Unterschiede in der Verteilung von membrangebundenem MICA und zytosolischem MICA vorliegen, wurden bei fünf Kontrollindividuen, jeweils vier Patienten mit Zöliakie unter und ohne GFD und bei einem Patienten mit refraktärer Zöliakie, sowohl die membrangebundene als auch die zytosolische Fraktion mit der Western-Blot-Methode analysiert. Bei allen Proben zeigten sich Banden bei 43 und 38 kDa, in den Kontrollen und Zöliakie-Patienten sogar eine dritte bei 55 kDa (Abb. 15). Der MICA-Genotyp bei diesen Patienten lag nicht vor.



Abb. 15: Verteilung von MICA/B in Kontrollindividuen, Patienten mit Zöliakie unter und ohne GFD und refraktärer Zöliakie. Die Proteinlevel der zytosolischen und membrangebundenen Fraktionen bei 38, 43 und 55 kDa wurden anteilig in Prozent der Membranfraktion aufgetragen.

Zu den Daten wurde der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Auf eine statistische Analyse wurde aufgrund der Einzelmessung in der RCD-Gruppe verzichtet, eine größere Anzahl konnte aufgrund von in zu geringer Menge vorliegendem Patientenmaterial nicht untersucht werden. Die Verteilung zeigt, dass sich die einzelnen Membrananteile der Gruppen gemessen am SEM nicht nennenswert unterscheiden. In allen Gruppen liegt jedoch ein deutlich größerer Anteil an membranösem MICA bei 43 kDa als bei 38 oder 55 kD vor.

Die mittleren Proteinlevel bei 43 kDa als Summe von membranösem und zytosolischem Protein sind in Tab. 11 aufgelistet. Hier zeigt sich eine geringere Menge an MICA/B in RCD und GFD gegenüber CD und Kontrollen. Im Aktin-Blot zeigte sich eine gleichmäßige Proteinmenge in allen Gruppen.

	Kontrolle	CD	GFD	RCD
Mittlere	28027	26947	13148	5449
MICA/B-Level				

Tab. 11: Mittelwerte der MICA/B-Level bei 43 kDa (zytosolisch plus membranös)

4.6 Ergebnisse der Färbungen zur subzellulären MICA/B-Lokalisation in Biopsien und Caco-2-Zellen

4.6.1 MICA/B in Duodenalbiopsien

In mit Immunfluoreszenz gefärbten Kryoschnitten von duodenalen Biopsien von CD-(n = 15), RCD-(n = 5) und Kontrollpatienten (n = 9) wurden MICA und MICB mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie dargestellt.

Dabei fand sich bei allen verwendeten Duodenalproben folgende subzelluläre Verteilung (s. Abb. 16):

1. Die Proteine MICA und MICB stellen sich in der Färbung im duodenalen Epithel, nicht aber im subepithelialen Bereich dar.

2. In den Enterozyten war ein basolaterales, aber besonders ein apikales, membranös erscheinendes MICA/B-Band deutlich erkennbar.

3. Zusätzlich zeigte sich ein intrazellulärer Anteil, der aufgrund der körnigen Verteilung eine Lokalisation in vesikulären Strukturen nahe legt.

4. Eine besonders starke Färbeintensität wurde um Epithelzellen festgestellt, die sich morphologisch wie Becherzellen darstellten.



Abb. 16: MICA/B im duodenalen Epithel von Patienten mit Zöliakie (CD), refraktärer Zöliakie (RCD) und Kontrollen (Ko). MICA/B rot, Zellkerne weiß dargestellt.

Im Folgenden werden die oben genannten Feststellungen anhand der Ergebnisse verschiedener experimenteller Ansätze erläutert.

Die subzelluläre Verteilung von MICA/B in den einzelnen Enterozyten wurde mithilfe des entwickelten Intensity-Plugins für das Programm ImageJ (s. Kapitel 3.2.4) vergleichbar gemacht und zusammengefasst graphisch dargestellt. Mithilfe dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass die mittlere Intensität von MICA/B am apikalen Pol der Zellen sowohl von Patienten mit Zöliakie und refraktärer Zöliakie als auch von Kontrollpatienten am größten ist (s. Abb. 17).

Die Daten wurden als Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Standardabweichung der Datenreihen ist groß, da die absoluten Intensitäten des MICA/B-Kanals in den einzelnen Bildern sehr unterschiedlich sind, wobei der der relative Verlauf jedoch bei allen Einzelanalysen vergleichbar ist: In Abb. 18 ist der Verlauf von vier Analysen einzelner Zellen dargestellt, die einen sehr ähnlichen relativen Verlauf aufzeigen.



Abb. 17: Intensitätsverteilung der MICA/B-Färbung. Eine quantitative Aussage ist hier nicht möglich, da die einzelnen Bilder nicht mit gleichen, sondern optimierten Einstellungen aufgenommen wurden.



Abb. 18: Einzelanalysen der MICA/B-Intensität von vier Zellen am Beispiel der Gruppe RCD

Um zu klären, ob der apikal lokalisierte Anteil tatsächlich membranös ist, wurden mehrere Gegenfärbungen mit Markern für die apikale Membran durchgeführt.

Das Tight-Junction-Protein ZO-1, das am intrazellulären Bereich der apikal-lateralen Membran lokalisiert ist, wurde nicht mit MICA kolokalisiert, sondern stellte sich apikal vom MICA/B-Band dar. Mit einem Antikörper gegen die intestinale alkalische Phosphatase, die in der apikalen Zellmembran liegt, ließ sich eine nur teilweise Kolokalisation des Enzyms mit MICA/B feststellen, wohingegen der Hauptteil des apikalen Signals direkt submembranal lokalisiert ist (s. Abb. 19 und 20).



Abb.19: MICA/B versus alkalische Phosphatase (AP) bzw. ZO-1 (grün). Kolokalisierte Anteile sind gelb dargestellt.



Abb. 20: Detailaufnahme mit MICA/B versus alkalische Phosphatase (grün). Kolokalisierende Anteile (gelb, gelber Pfeil) gegenüber einem Anteil der AP, der weiter apikal als MICA/B sichtbar ist (grüner Pfeil).

Mit E-Cadherin und dem Tight-Junction-Protein Claudin 4 wurden Teile der lateralen Membran markiert. MICA/B verläuft an der lateralen Membran entlang dem Claudin-4-Signal und parallel zu E-Cadherin (s. Abb. 21).



Abb. 21: MICA/B (rot) versus Claudin 4 bzw. E-Cadherin (grün). Kolokalisierte Anteile sind gelb dargestellt.

Um das Kompartiment zu finden, in dem sich der intrazelluläre MICA/B-Anteil befindet, wurden mithilfe der Immunfluoreszenz verschiedene Marker für intrazelluläre Kompartimente dargestellt und im Hinblick auf eine Kolokalisation mit der MICA/B-Färbung untersucht.

Der intrazelluläre Anteil der MIC-Proteine konnte keinem untersuchten Kompartiment eindeutig zugeordnet werden. Die Kolokalisationsanalysen in humanen Biopsien zeigten, dass ein Teil der MIC-Fraktion im apikalen Bereich auf rab-3b-positiven Vesikeln und auf IgA-enthaltenden Bereichen nachweisbar war (s. Abb. 22 u. 23). Für das in der Zellmitte liegende vesikulär erscheinende Signal fand sich mit den durchgeführten Gegenfärbungen keine Entsprechung. Tab. 12 und Abb. 22-25 fassen die Kolokalisationsstudien zusammen.

Die Färbung von Caveolin konnte trotz zahlreicher unterschiedlicher Etablierungsversuche nicht aussagekräftig genug gestaltet werden, um eine Kolokalisation eindeutig untersuchen zu können.



Abb. 22: MICA/B (rot) in Gegenfärbung zu IgA und rab3b (grün). Kolokalisierende Bereiche sind gelb dargestellt.



Abb. 23: Detailaufnahme mit MICA/B (rot) versus rab3b bzw. IgA (grün). Kolokalisierende Anteile sind gelb dargestellt.



Abb. 24: MICA/B (rot) in Gegenfärbung zu Caveolin, CD71 und Clathrin (grün)


Abb. 25: MICA/B (rot) in Gegenfärbung zu Golgin, Hrs, rab5, rab11 und Tubulin (grün)

Antikörper gegen	Marker für	Kolokalisation
Caveolin	Caveolae	nicht eindeutig
CD71	Transferrinrezeptor	keine
Clathrin	Clathrin-coated pits	keine
Golgin	Golgi-Apparat	keine
Hrs	multivesicular bodies	keine
IgA	-	teilweise, apikal
rab3b	sekretorische Vesikel	teilweise, apikal
rab5	frühe Endosomen	keine
rab11	Recycling-Endosomen	keine
Tubulin	Mikrotubuli	keine

Tab. 12: Übersicht über die Kolokalisationssstudien in Duodenalbiopsien

Eine Gegenfärbung mit dem Antikörper gegen MUC-2, einem Marker für intestinale Becherzellen, bestätigte, dass die besonders stark MICA/B-angefärbten Bereiche die intraepithelialen Becherzellen umgeben (s. Abb. 26).



Abb. 26: Gegenfärbung von MICA/B und Mucin-2 im duodenalen Epithel. MICA/B rot, Mucin-2 grün, Zellkerne blau dargestellt.

Eine Korrelation der MICA/B-Farbintensität zur Lokalisation der intraepithelialen T-Lymphozyten konnte in Gegenfärbungen mit einem CD3-Antikörper nicht gefunden werden (Abb. 27).



Abb. 27: Gegenfärbung von MICA/B (rot) und CD3 (grün) als Marker für intraepitheliale T-Zellen im duodenalen Epithel. Die Intensität des MIC/B-Signals ist unabhängig von der Lage zu den IEL. Zellkerne sind blau dargestellt.

Um zu untersuchen, welchen Anteil MICB am Signal der MICA/B-Färbung hat, wurde das Protein mit einem spezifischen Antikörper dargestellt, wobei sich in der Immunfluoreszenzfärbung ein überwiegend apikales, aber nicht membranös erscheinendes Signal zeigte (s. Abb. 28).



Abb. 28: MICB (grün) im duodenalen Epithel. Zellkerne sind weiß dargestellt.

4.6.2 MICA/B in Caco-2-Zellen

Die mittels Immunfluoreszenz gefärbten Caco-2-Zellen wurden mit dem Konfokalmikroskop als Z-Stacks aufgenommen, um die markierten Moleküle in den Zellen in allen drei Raumebenen beurteilen zu können. Der Abstand zwischen den Schnittebenen betrug 0,3 μ m. Jede Färbung in Kombination mit MICA/B wurde dreimal an verschiedenen Zellkulturfiltern durchgeführt.

In Caco-2-Zellen stellt sich MICA/B durch die Färbung ebenfalls basolateral und auch auch apikal dar. Wie in den Duodenalbiopsien zeigte sich auch hier ein intrazellulärer vesikulär erscheinender Anteil (s. Abb. 29).



Abb. 29: MICA/B in Caco2-Zellen. a-b: Rekonstruktion eines Längsschnittes durch eine Zellreihe in einem Z-Stack. Querschnitt durch Caco-2-Zellen auf basaler (c), mittlerer (d) und apikaler Höhe (e). MICA/B ist rot, Nuclei sind blau dargestellt.

Die Membranfärbungen mit dem Antikörper gegen die alkalische Phosphatase ergaben eine Kolokalisation in wenigen Bereichen des apikalen MICA/B-Signals. ZO-1 kam auch in Caco-2-Zellen etwas weiter apikal zur Darstellung als die MIC-Proteine. Die apikale Membran wurde außerdem mit Lectin-FITC markiert, das überwiegend ebenfalls apikaler als die MICA/B-Färbung erkennbar war. Mit E-Cadherin waren an der basolateralen Membran keine kolokaliserenden Anteile erkennbar (s. Abb. 30).



Abb. 30: MICA/B (rot) in Gegenfärbung zu ZO-1, alkalischer Phosphatase (AP), E-Cadherin und Lectin (grün), jeweils als Längs- und Querschnitte dargestellt.

Da sich in der Aufsicht auf die apikale Zelloberfläche der Eindruck einer submembranösen netzartigen Struktur im MICA/B-Kanal ergab, wurde Aktin durch Bindung von fluoreszenzmarkiertem Phalloidin als Gegenfärbung dargestellt. Hier zeigte sich allerdings keine Kolokalisation (s. Abb. 31).





Abb. 31: Darstellung von Aktin (rot) mithilfe von Phalloidin in Gegenfärbung zu MICA/B (hier grün dargestellt) als Längs- (a) und Querschnitt (b) in Caco-2-Zellen

Durch Darstellung der *Lipid rafts* mit GM1 und CTX-B zeigte sich eine deutliche Kolokalisation mit MICA/B im apikalen Bereich der Zellen. Bei der Behandlung mit Methyl-β-Cyclodextrin veränderte sich nicht nur das Muster der *Lipid rafts*, sondern auch die apikale MICA/B-Verteilung (s. Abb. 32). Der erfolgreiche Cholesterolentzug konnte dabei mit Filipin nachgewiesen werden.



Abb. 32: MICA/B (rot) gegenüber GM1 (grün) in Quer- und Längsschnitten. In Bildreihe a unbehandelt, in Reihe b nach Cholesterolentzug mit Methyl-β-Cyclodextrin.

Die Gegenfärbungen zu MICA/B zur Darstellung des Kompartiments, das das vesikulär erscheinende MICA/B-Kompartiment enthält, erbrachten folgende Ergebnisse: Auch in Caco-2-Zellen konnte das intrazelluläre MIC nicht eindeutig einem Kompartiment zugeordnet werden, es fand sich aber wie in humanen Biopsien ein geringer Anteil, der mit rab-3b-positiven Vesikeln kolokalisiert (s. Tab. 13, Abb. 33-34).



Abb. 33: MICA/B (rot) versus rab3b (grün) in Längs- und Querschnitten durch Caco-2-Zellen. Kolokalisierende Anteile sind gelb dargestellt.



Abb. 34: MICA/B (rot) in Gegenfärbung zu Caveolin, CD71, Clathrin, Golgin, Hrs, rab3b, rab5, rab11 und Tubulin (grün).

Antikörper gegen	Marker für	Kolokalisation
Caveolin	Caveolae	nicht eindeutig
CD71	Transferrinrezeptor	keine
Clathrin	Clathrin-coated pits	keine
Golgin	Golgi-Apparat	keine
Hrs	multivesicular bodies	keine
rab3b	sekretorische Vesikel	teilweise, apikal
rab5	frühe Endosomen	keine
rab11	Recycling-Endosomen	keine
Tubulin	Mikrotubuli	keine

Tab. 13: Übersicht über die Kolokalisationssstudien in Caco-2-Zellen

5 Diskussion

5.1 Häufigkeit des MICA-Allels A5.1

In der Literatur gibt es derzeit widersprüchliche Ergebnisse zu der Frage, ob das MICA-Allel-A5.1 bei Patienten mit Zöliakie im Vergleich zu gesunden Individuen gehäuft auftritt, und inwieweit dieses Allel mit einem attenuierten klinischen Verlauf bei den Patienten assoziiert ist.

Die Größe der im Rahmen der DNA-Sequenzierung durch PCR in der vorliegenden Arbeit hergestellten Amplifikate entspricht der gemäß Ota et al. erwarteten Größe [84], die ermittelten Sequenzen stimmen zu 100 % mit der bei Robinson et al. [65] gelisteten Basenreihenfolge für die verschiedenen Allele überein.

Das signifikant häufigere Auftreten des Allels A5.1 bei Patienten mit Zöliakie gegenüber Kontrollindividuen unterstützt die Aussage einer Assoziation dieses Allels mit dem Auftreten einer Zöliakie [7, 75-77]. Auch in unserem Patientenkollektiv steht dies im Widerspruch zu den Daten von Hue et al. und Woolley et al. [24, 80]. Ob sich die Häufung des Allels MICA A5.1 bei der Zöliakie aber auch alternativ z.B. durch Kopplung erklärt, lässt sich mit der hier angewandten Methodik allein nicht klären.

5.2 Korrelation der Genetik mit Klinik und Histologie der Patienten

5.2.1 Korrelation von Genetik und Klinik

Aufgrund der geringen Gruppengrößen ließ sich kein signifikanter Unterschied der klinischen Symptomatik in Abhängigkeit vom Vorliegen des MICA-Allels A5.1 ermitteln. Die erhobenen Daten weisen allerdings die Tendenz auf, dass A5.1-homo- oder heterozygote Patienten nicht häufiger eine oligosymptomatische Klinik aufweisen, was den Beobachtungen von Tinto et al. [77] und Lopez-Vazquez et al. [7] widerspricht. Ebenfalls zeigt sich kein späteres Auftreten der Erkrankung bei Patienten, die für ein MICA-A5.1-Allel homozygot sind. Obwohl bei A5.1-homozygoten Patienten die Zelllyse über MICA allein durch die Lokalisation ineffektiv sein dürfte, findet sich bei sechs der

acht A5.1-Homozygoten eine Zottenatrophie vom Typ Marsh III, lediglich zwei zeigen einen Marsh-Typ 1 bzw. Marsh-Typ 0. Zudem wurde bei Patienten mit RCD und demnach ausgeprägten histologischen Veränderungen im Vergleich zu denen mit CD kein selteneres Auftreten des MICA-Allels A5.1 gefunden, obwohl hier die Zelllyse sogar allein über die MICA-NKG2D-Interaktion ausgelöst werden kann. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Grad der mukosalen Läsion durch apikal lokalisiertes MICA nicht nennenswert vermindert, sondern dass die Lyse über andere Wege – möglicherweise durch kompensatorisch vermehrte Expression von MICB – aufrechterhalten wird.

Somit bleibt vorerst ungeklärt, warum das MICA-Allel A5.1 bei Patienten mit Zöliakie häufiger auftritt als in der Normalpopulation. Es gilt aber anzumerken, dass die Funktion der kleinen intrazellulären Domäne des MICA und damit verbunden einer eventuell auch nach intrazellulär (d.h. in den Enterozyten) gerichteten Signaltransduktion weitgehend unbekannt ist. Sollte es eine solche Signalvermittlung zum Enterozyten hin geben, wäre möglicherweise hier die Ursache für die unterschiedliche Verteilung der MICA-Allele zu suchen.

5.2.2 Korrelation von Genetik und Histologie

Zur Klärung der Frage, ob die Mutation in den MICA-A5.1-Allelen und die resultierende Trunkation des Proteins auch *in vivo* mit einer Veränderung der Lokalisation assoziiert ist, wurde MICA in Biopsien aus Patienten mit bekanntem MICA-Genotyp angefärbt. Die immunhistochemische Darstellung zeigte – im Gegensatz zu der von Hue et al. [24] durchgeführten Färbung – deutliche Unterschiede in dessen subzellulärer Lokalisation auf, die den Beobachtungen in MDCK-Zellen durch Suemizo et al. [69] entsprechen. Das durch die Guanininsertion trunkierte Protein wird demnach auch in Zellen humaner duodenaler Biopsien auf der apikalen anstatt der basolateralen Membran exprimiert. In der Immunfluoreszenzfärbung mit dem MICA/B-Antikörper fand sich diese Verteilung nicht, was vermutlich der gleichzeitigen Markierung von MICA und MICB geschuldet ist. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von MICA und MICB ist jedoch eine spezifische Anfärbung kaum möglich. Alle getesteten Antikörper zeigten sowohl in der Immunfluoreszenz als auch im Western-Blot eine zu schwache Bindung in den Biopsieund Zellkulturproben, die vom Hintergrundsignal kaum abwich und somit nicht

auszuwerten war. Die Immunhistochemie lieferte vermutlich aufgrund der Signalverstärkung durch die Peroxidasereaktion eindeutigere Ergebnisse.

5.3 MICA/B-Proteinlevel

In der Literatur wurde bereits mittels Flusszytometrie und Immunhistochemie eine gesteigerte MICA-Expression bei Patienten mit refraktärer Zöliakie und unbehandelter Zöliakie gegenüber gesunden Individuen gezeigt.

Die Western-Blot-Analyse von MICA/B in Duodenalbiopsien in dieser Arbeit zeigte Banden bei 43 und 38 kDa, aber auch bei 55 kDa. Die Bande bei 43 kDa enspricht den Daten von Groh et al. [54] als Größe des vollständigen, nicht glykosylierten Proteins, 38 kDa ist als Gewicht der trunkierten Variante beschrieben [57], wobei in diesen Studien ein spezifischer MICA-Antikörper verwendet wurde. Die Bande bei 55 kDa kann am ehesten als Darstellung von noch teilweise glykosyliertem Protein verstanden werden, da kein spezieller Deglykosylierungsschritt beim Western-Blotting erfolgte.

In Caco-2-Zellen zeigte sich in unseren Untersuchungen lediglich eine Bande bei 43 kDa. Hier wurde im Gegensatz zu den duodenalen Proben das Gesamtprotein isoliert, nicht die Membran- und Zytosolfraktionen getrennt. Die unterschiedliche Methodik könnte das Ergebnis in diesem Fall beeinflusst haben.

Bei 43 kDa fand sich eine deutlich vermehrte Expression von MICA/B in Patienten mit refraktärer Zöliakie, wobei im Gegensatz zu den Untersuchungen von Hue et al. [24] die Level der unbehandelten Patienten mit Zöliakie unter denen der Patienten unter GFD und annähernd auf Höhe der Kontrollindividuen lagen.

Neben der geringen Gruppengröße könnte hierfür die alleinige Darstellung der Membranfraktion des Proteins verantwortlich sein, wenn eine insgesamt gesteigerte MICA-Menge mit geringerer membranöser Fraktion vorläge. Allerdings zeigte sich in der Gegenüberstellung von membranösem und zytosolischem Protein keine insgesamt gesteigerte MICA-Menge in den getesteten aktiven Zöliakiepatienten gegenüber denen unter GFD.

Zudem konnte kein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen der trunkierten MICA-Variante und der Bandengröße im Western-Blot gezeigt werden, was eventuell durch die Verwendung des Antikörpers gegen MICA und MICB zu erklären ist. Auch möglich ist, dass die Bande bei 38 kDa lediglich ein unspezifisches Spaltprodukt darstellt. Deutlich wurde aber, dass MICA/B mit der Größe 43 kDa den größten Membrananteil aufweist, wohingegen bei 38 kDa ein deutlich größerer Anteil an zytosolischem Protein besteht. Entspräche dies der trunkierten MICA-Variante, könnte die Verkürzung der Transmembrandomäne eine schwächere Membranbindung zur Folge haben. Die Tatsache, dass 38 kDa große MICA-Proteine bei Patienten jedes Genotyps gefunden werden konnten, passt zu dem fluoreszenzmikroskopischem Nachweis von apikalem MICA/B in allen untersuchten Patientenproben und könnte Hinweis auf eine posttranslationale Prozessierung des Proteins sein.

In weiteren Studien müssten Versuche mit einer größeren Patientenzahl inklusive einer Analyse des Gesamtproteins und wenn möglich unter Verwendung eines spezifischen MICA-Antikörpers durchgeführt werden, um die bislang unklaren Aspekte genauer zu beleuchten.

5.4 Subzelluläre Lokalisation von MICA/B

Zur Klärung der genauen subzellulären Lokalisation von MICA/B wurden Immunfluoreszenzfärbungen an duodenalen Biopsien und an Caco-2-Zellen durchgeführt.

Wie bei Groh et al. [54] und Hue et al. [24] an Färbungen der intestinalen Mukosa beobachtet, fanden sich sowohl in den hier durchgeführten immunhistochemischen als auch Immunfluoreszenzfärbungen MICA bzw. MICA und MICB bei Zöliakiepatienten und Kontrollen nur im duodenalen Epithel.

Der Verlauf der subzellulären Intensitätsverteilung von MICA/B in Biopsien zeigt, dass im apikalen Bereich der Zellen der größte Anteil an MICA/B vorliegt.

5.4.1 Membranfärbungen

Die Ergebnisse der gleichzeitigen Färbung von ZO-1 und MICA/B in Biopsien deuten darauf hin, dass der starke apikale Anteil der MIC-Proteine eher im submembranösen Bereich konzentriert ist, da sich ZO-1 weiter apikal als MICA/B darstellt. Da jedoch die Markierung der intestinalen alkalischen Phosphatase parallel zu MICA/B ebenfalls einen

kolokalisierenden Anteil vorweist, ist davon auszugehen, dass das apikale MIC nicht nur submembranös, sondern auch innerhalb der apikalen Membran liegt.

In Caco-2-Zellen weisen die Färbungen MICA/B versus ZO-1 bzw. Lectin ebenfalls auf eine submembranöse Lokalisation von MIC hin, auch hier scheint aber aufgrund der Kolokalisation einiger apikaler MICA/B-Anteile mit der alkalischen Phosphatase eine membranöse MIC-Fraktion vorzuliegen.

Sowohl in Biopsien von Patienten mit und ohne Allel A5.1 als auch in Caco-2-Zellen, die die trunkierte MICA-Variante nicht tragen, existiert demnach ein apikaler Anteil an MIC-Proteinen, der nicht nur submembranös, sondern auch in der Membran vorliegt. Die immunhistochemische Färbung von MICA an Biopsien konnte zeigen, dass MICA aber in Biopsien abhängig vom Genotyp apikal bzw. basolateral lokalisiert ist, weshalb sich die Frage stellt, ob das in der Darstellung von MICA <u>zusammen mit</u> MICB immer erkennbare membranöse apikale Signal allein durch MICB zu erklären ist. In der spezifischen Färbung von MICB zeigte sich zwar ein überwiegend apikales Signal, dies war jedoch nicht als deutlich membranös einzuordnen. Sollten MICB und MICA auch als nach luminal gerichtete Transmembranproteine auftreten, könnten sie eine zusätzliche Funktion neben der Bindung an NKG2D-Rezeptoren ausüben.

Im Hinblick auf das starke MICA/B-Signal um die intestinalen Becherzellen in den Biopsien könnte man spekulieren, dass der Antikörper gegen MICA/B zusätzlich Mucin bindet, das sowohl in den Becherzellen als auch im Bürstensaum der Zellen, also apikal auftritt. Dagegen spricht allerdings, dass weder Mucin-1, das unter anderem auf der Oberfläche der Enterozyten exprimiert wird, noch Mucin-2, das in intestinalen Becherzellen produziert wird [91], eine in der Aminosäuresequenz annähernde Ähnlichkeit zu MICA oder MICB aufweisen. Des Weiteren kam mit dem Antikörper im Western-Blot eine deutliche Bande bei 43 bzw. 38 kDa zur Darstellung, die der Größe von MICA und MICB, nicht der der Mucine, die aus weit über 1000 Aminosäuren bestehen [92, 93], entspricht.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Kolokalisation der *Lipid rafts* mit MICA/B in Caco-2-Zellen ist ein weiterer Hinweis auf die apikal-membranöse Lokalisation von MIC, die durch das veränderte Verteilungsmuster beim Cholesterolentzug bekräftigt wird. Die bereits in Daudi-Zellen festgestellte Lokalisation von MICA in *Lipid rafts* [81] konnte demnach auch in Caco-2-Zellen gezeigt werden.

Signale für eine basolaterale Sortierung liegen häufig in der zytoplasmatischen Domäne des Proteins, sodass ein Fehlen dieser Domäne ein apikale Lokalisation von MICA

erklären würde (s. auch Suemizo et al., Kap. 2.2.1). Für eine apikale Lokalisation sind Sequenzen innerhalb der Transmembrandomäne, an einem Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) oder auch eine Glykosylierung an der extrazellulären Domäne verantwortlich. Der Einbau in die apikale Membran kann entweder direkt vom Trans-Golgi-Netzwerk, über Endosomen oder auch per Transzytose nach vorherigem Einbau in die basolaterale Membran erfolgen. Signale für eine basolaterale Lokalisation scheinen meist dominant über die für eine apikale zu sein, die Mechanismen sind jedoch bislang nicht abschließend geklärt. *Lipid rafts* spielen ebenfalls eine Rolle in der Sortierung nach apikal, indem sie den Proteinen als Transporter für den Einbau in die apikale Membran dienen [94].

Bei Patienten mit dem MICA-Allel-A5.1 ist demnach eine Lokalisation in der apikalen Membran nicht verwunderlich; auch die Assoziazion mit *Lipid rafts* ist gut erklärbar. Unklar bleibt jedoch, warum das apikale Signal bei allen Duodenalbiopsien, also auch bei Patienten ohne die A5.1-Mutation, gefunden wurde. In den Western-Blot-Analysen zeigte sich ebenfalls in allen Proben eine 38-kDa-Bande, die der Größe des trunkierten MICA entspricht. Eine mögliche Erklärung für beide Phänomene wäre die posttranslationale Prozessierung des Proteins, was allerdings auf eine weitere Funktion von MICA hinweist. In Anbetracht der starken Glykosylierung des Membranproteins käme auch eine veränderte Extrazellulärdomäne als Ursache für die veränderte Lokalisation in Betracht.

5.4.2 Intrazelluläre Marker

Für die Kolokalisationsanalysen wurden Färbungen mit Antikörpern gegen Marker für verschiedene Zellkompartimente durchgeführt, um das Kompartiment zu identifizieren, das das intrazelluläre MICA/B enthält.

Die Untersuchungen der Rab-Proteine zeigte eine Assoziation von MICA/B mit dem Exozytose-Marker rab3b an der apikalen Membran.

Rab-Proteine sind Membranproteine mit GTPase-Aktivität, die eine zentrale Rolle in der Koordination der intrazellulären Transportwege spielen. Vesikel werden durch die unterschiedlichen Rab-Proteine für Endo-, Trans- und Exozytose von einem Zellkompartiment abgespalten, um mit einem anderen zu fusionieren [95]. Mitglieder der Rab-3-Familie (rab3a-d) regulieren die Trans- und Exozytose und sind daher unter anderem auf Drüsenzellen, aber auch in anderen Epithelien wie dem intestinalen

Epithel (rab3b) vertreten. Rab3a und 3c sind überwiegend als vesikuläre Strukturen innerhalb der Zellen anzufärben [96-99], wohingegen rab3b an der apikalen Zellmembran lokalisiert ist [100]. Die Kolokalisation mit rab-3b-positiven Vesikeln in Zellen humaner Biopsien und Caco-2-Zellen könnte demnach darauf hinweisen, dass die kolokalisierenden MIC-Proteine sezerniert werden, wobei es sich aufgrund der apikalen Lokalisation jedoch nicht um das im Serum nachweisbare sMICA handeln kann, da dies aus dem basolateralen Pol endokrin sezerniert wird. Auch die am apikalen Pol auf einigen IgA enthaltenden Bereichen nachweisbaren MIC-Proteine könnten für eine luminale Sekretion sprechen: IgA wird als Teil des mukosalen Immunsystems durch den Rezeptor für polymeres IgA von basal als Dimer in die Enterozyten aufgenommen und via Transzytose über die apikale Membran nach luminal transportiert, wo es Antigene bindet. Die Transzytose erfolgt über eine Reihe von Vesikeln: An der basolateralen Membran über *Clathrin-coated pits* und basolaterale frühe Endosomen, weiter an Miktotubuli gebunden und über apikale Recycling-Endosomen an die apikale Membran [101].

Keine Kolokalisation fand sich jedoch in unserer Studie mit CD71, dem Transferrinrezeptor, der apikal laut Matysiak-Budnik et al. auch IgA bindet und zur Internalisierung von IgA-Gliadinpeptid-Komplexen beiträgt. Im Gegensatz zu dieser Untersuchung, die eine im Vergleich zu Kontrollen verstärkte und deutlich apikale Lokalisation von CD71 in Biopsien von Zöliakiepatienten sowie eine Kolokalisation mit IgA zeigt [15], konnte der Transferrinrezeptor in der hier durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung nur intrazellulär und supranukleär dargestellt werden.

Die Internalisierung von Proteinen der Plasmamembran erfolgt über *Clathrin-coated pits* [102] und Caveolae, d.h. caveolinhaltige *Lipid rafts* [103]. MICA/B scheint nicht mit diesen Strukturen assoziiert zu sein, wobei eine eindeutige Aussage über die Kolokalisation von Caveolin mit MICA/B wegen zu schwacher Signale in der Immunfluoreszenz nicht möglich war.

Aufgrund der Untersuchung von rab-5 (frühe Endosomen), Hrs-2 (späte Endosomen, *multivesicular bodies*) und rab-11 (Recycling-Endosomen) versus MICA/B, bei der keine Kolokalisation festgestellt wurde, kann angenommen werden, dass kein großer Anteil von MICA/B via Endozytose aufgenommen oder recycelt wird.

Die fehlende Kolokalisation mit Golgin und Tubulin zeigt, dass der Hauptteil des supranukleär lokalisierten intrazellulären MIC sich nicht im Golgi-Apparat befindet oder an Mikrotubuli gebunden ist.

Die fehlende eindeutige Zuordnung zu einem vesikulären Kompartiment durch unsere Untersuchungen könnte damit erklärt werden, dass MICA/B zytosolisch vorliegt, wobei in diesem Fall eher ein homogenes Muster innerhalb der Zellen zu erwarten gewesen wäre.

5.5 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass das MICA-A5.1-Allel bei Patienten mit Zöliakie häufiger vorliegt als bei gesunden Kontrollindividuen. Eine in der Literatur zuvor beschriebene Häufung mit einem attenuierten Krankheitsverlauf der Zöliakie fand sich jedoch nicht. Die A5.1-Variante scheint aber einen Zusammenhang mit der subzellulären Lokalisation von MICA in humanen Duodenalbiopsien zu haben, was bisher nur an MDCK-Zellen *in vitro* gezeigt werden konnte.

Die Western-Blot-Analysen ergaben eine andere Verteilung der Proteinlevel von MICA und MICB in Patienten mit Zöliakie gegenüber refraktärer Zöliakie und Kontrollen als bislang in der Literatur bekannt, allerdings waren in unserer Studie die Patientenzahlen für eine ausreichende statistische Aussage zu klein. Weitere Tests mit größeren Patientengruppen müssten durchgeführt werden, um festzustellen, ob eine signifikante Abweichung vorliegt. Im Unterschied zum bisherigen Stand der Wissenschaft konnten 38 kDa große MICA-Varianten bei nahezu allen Proben unabhängig vom MICA-A5.1-Genotyp gefunden werden.

Die subzelluläre Lokalisation von MICA/B in intestinalen Epithelzellen konnte nur teilweise näher charakterisiert werden. Auch hier wäre eine genaue Differenzierung zwischen MICA und MICB wünschenswert. Die konstant beobachtete Lokalisation von MICA/B am apikalen Pol der Zellen sowie die Assoziation mit sekretorischen Strukturen an der apikalen Zellmembran weisen auf eine bislang ungeklärte Funktion von MIC-Proteinen in der Zelle hin, die nur mit funktionellen Analysen und Untersuchungen der Signaltransduktion geklärt werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- 1. Gemoll, W., Vretska, K., Kronasser, H., *Griechisch-deutsches Schul- und Handwörterbuch.* 9. Auflage 1965, München: Oldenburg Schulbuchverlag. S. 443.
- 2. Troncone, R., Jabri, B., *Coeliac disease and gluten sensitivity.* J Intern Med, 2011. 269(6): p. 582-90.
- 3. Lionetti, E., Catassi, C., *New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment.* Int Rev Immunol, 2011. 30(4): p. 219-31.
- 4. Mustalahti, K., Catassi, C., Reunanen, A., et al., *The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project.* Ann Med, 2010. 42(8): p. 587-95.
- 5. Megiorni, F., Mora, B., Bonamico, M., et al., *HLA-DQ and susceptibility to celiac disease: evidence for gender differences and parent-of-origin effects.* Am J Gastroenterol, 2008. 103(4): p. 997-1003.
- 6. Herold, G., Innere Medizin. 2012, Köln, S. 463.
- 7. Lopez-Vazquez, A., Rodrigo, L., Fuentes, D., et al., *MICA-A5.1 allele is associated with atypical forms of celiac disease in HLA-DQ2-negative patients.* Immunogenetics, 2002. 53(10-11): p. 989-91.
- 8. Daum, S., Zeitz, M., *Klinisches Spektrum der einheimischen Sprue.* Dtsch Med Wochenschr, 2004. 129 Suppl 2: p. S79-81.
- 9. Stowasser, J.M., Petschenig, M., Skutsch, F., *Lateinisch-deutsches Schulwörterbuch*. Auflage 1998, München: R. Oldenburg Verlag. S. 226.
- 10. Sumner-Smith, M., Rafalski, J.A., Sugiyama, T., Stoll, M., Soll, D., *Conservation and variability of wheat alpha/beta-gliadin genes.* Nucleic Acids Res, 1985. 13(11): p. 3905-916.
- 11. Koning, F., Gilissen, L., Wijmenga, C., *Gluten: a two-edged sword. Immunopathogenesis of celiac disease.* Springer Semin Immunopathol, 2005. 27(2): p. 217-32.
- 12. Sollid, L.M., *Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder.* Nat Rev Immunol, 2002. 2(9): p. 647-55.
- 13. Nistico, L., Fagnani, C., Coto, I., et al., *Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins.* Gut, 2006. 55(6): p. 803-8.
- 14. Tjon, J.M., van Bergen, J., Koning, F., *Celiac disease: how complicated can it get?* Immunogenetics, 2010. 62(10): p. 641-51.
- 15. Matysiak-Budnik, T., Moura, I.C., Arcos-Fajardo, M., et al., Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. J Exp Med, 2008. 205(1): p. 143-54.
- 16. Schumann, M., Richter, J.F., Wedell, I., et al., *Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue.* Gut, 2008. 57(6): p. 747-54.
- 17. Gianfrani, C., Auricchio, S., Troncone, R., *Adaptive and innate immune responses in celiac disease.* Immunol Lett, 2005. 99(2): p. 141-5.
- 18. Ciccocioppo, R., Finamore, A., Ara, C., Di Sabatino, A., Mengheri, E., Corazza, G.R., *Altered expression, localization, and phosphorylation of epithelial junctional proteins in celiac disease.* Am J Clin Pathol, 2006. 125(4): p. 502-11.
- 19. Daum, S., Bauer, U., Foss, H.D., et al., *Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease.* Gut, 1999. 44(1): p. 17-25.
- 20. Janeway, C.A.j., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., *Immunologie*. Kap. 10, Die adaptive Immunität gegenüber Infektionen. 5. Auflage 2002, Heidelberg: Spektrum Akadademischer Verlag. S. 409-455.
- 21. Janeway, C.A.j., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., *Immunologie*. Kap. 3, Antigenerkennung durch B- und T-Zell-Rezeptoren. 5. Auflage 2002, Heidelberg: Spektrum Akadademischer Verlag. S. 99-129.

- 22. Verbeek, W.H., von Blomberg, B.M., Scholten, P.E., Kuik, D.J., Mulder, C.J., Schreurs, M.W., *The presence of small intestinal intraepithelial gamma/delta T-lymphocytes is inversely correlated with lymphoma development in refractory celiac disease.* Am J Gastroenterol, 2008. 103(12): p. 3152-8.
- 23. Groh, V., Steinle, A., Bauer, S., Spies, T., *Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells.* Science, 1998. 279(5357): p. 1737-40.
- 24. Hue, S., Mention, J.J., Monteiro, R.C., et al., *A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease.* Immunity, 2004. 21(3): p. 367-77.
- 25. Mention, J.J., Ben Ahmed, M., Begue, B., et al., *Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease.* Gastroenterology, 2003. 125(3): p. 730-45.
- 26. Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., et al., *Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease.* Immunity, 2004. 21(3): p. 357-66.
- 27. Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., et al., *Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease.* Nat Med, 1997. 3(7): p. 797-801.
- 28. Chorzelski, T.P., Beutner, E.H., Sulej, J., et al., *IgA anti-endomysium antibody. A new immunological marker of dermatitis herpetiformis and coeliac disease.* Br J Dermatol, 1984. 111(4): p. 395-402.
- 29. Salmi, T.T., Collin, P., Korponay-Szabo, I.R., et al., *Endomysial antibody-negative coeliac disease: clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits.* Gut, 2006. 55(12): p. 1746-53.
- 30. Lindfors, K., Maki, M., Kaukinen, K., *Transglutaminase 2-targeted autoantibodies in celiac disease: Pathogenetic players in addition to diagnostic tools?* Autoimmun Rev, 2010. 9(11): p. 744-9.
- 31. Marietta, E.V., Camilleri, M.J., Castro, L.A., Krause, P.K., Pittelkow, M.R., Murray, J.A., *Transglutaminase autoantibodies in dermatitis herpetiformis and celiac sprue.* J Invest Dermatol, 2008. 128(2): p. 332-5.
- 32. Zhernakova, A., van Diemen, C.C., Wijmenga, C., *Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases.* Nat Rev Genet, 2009. 10(1): p. 43-55.
- 33. Jackson, J.R., Eaton, W.W., Cascella, N.G., Fasano, A., Kelly, D.L., *Neurologic and Psychiatric Manifestations of Celiac Disease and Gluten Sensitivity.* Psychiatr Q, 2011.
- 34. Tack, G.J., Verbeek, W.H., Schreurs, M.W., Mulder, C.J., *The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment.* Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010. 7(4): p. 204-13.
- 35. Crowe, S.E., *In the clinic. Celiac disease.* Ann Intern Med, 2011. 154(9): p. ITC5-1-ITC5-15; quiz ITC5-16.
- 36. Rodrigo-Saez, L., Fuentes-Alvarez, D., Perez-Martinez, I., et al., *Differences between pediatric and adult celiac disease.* Rev Esp Enferm Dig, 2011. 103(5): p. 238-44.
- 37. Sperandeo, M.P., Tosco, A., Izzo, V., et al., *Potential celiac patients: a model of celiac disease pathogenesis.* PLoS One, 2011. 6(7): p. e21281.
- 38. AI-Toma, A., Verbeek, W.H., Mulder, C.J., *Update on the management of refractory coeliac disease.* J Gastrointestin Liver Dis, 2007. 16(1): p. 57-63.
- 39. Daum, S., Weiss, D., Hummel, M., et al., *Frequency of clonal intraepithelial T lymphocyte proliferations in enteropathy-type intestinal T cell lymphoma, coeliac disease, and refractory sprue.* Gut, 2001. 49(6): p. 804-12.
- 40. Janeway, C.A.j., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., *Immunologie*. Kap. 6, Signalgebung durch Rezeptoren des Immunsystems. 5. Auflage 2002, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. S. 202-237.
- 41. Janeway, C.A.j., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., *Immunologie*. Kap. 1, Grundbegriffe der Immunologie. 5. Auflage 2002, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. S. 1-36.
- 42. van Wanrooij, R.L., Schreurs, M.W., Bouma, G., et al., *Accurate classification of RCD requires flow cytometry.* Gut, 2010. 59(12): p. 1732.

- 43. AI-Toma, A., Verbeek, W.H., Hadithi, M., von Blomberg, B.M., Mulder, C.J., *Survival in refractory coeliac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma: retrospective evaluation of single-centre experience.* Gut, 2007. 56(10): p. 1373-8.
- 44. Daum, S., Ipczynski, R., Schumann, M., Wahnschaffe, U., Zeitz, M., Ullrich, R., *High rates of complications and substantial mortality in both types of refractory sprue.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2009. 21(1): p. 66-70.
- 45. Malamut, G., Afchain, P., Verkarre, V., et al., *Presentation and long-term follow-up of refractory celiac disease: comparison of type I with type II.* Gastroenterology, 2009. 136(1): p. 81-90.
- 46. Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabo, I.R., et al., *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease.* J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2012. 54(1): p. 136-60.
- 47. Walker-Smith, J.A., Guandalini, S., Schmitz, J., Shmerling, D.H., Visakorpi, J.K., *Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition.* Arch Dis Child, 1990. 65(8): p. 909-11.
- 48. Marsh, M.N., *Grains of truth: evolutionary changes in small intestinal mucosa in response to environmental antigen challenge.* Gut, 1990. 31(1): p. 111-4.
- 49. Oberhuber, G., Granditsch, G., Vogelsang, H., *The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 1999. 11(10): p. 1185-94.
- 50. Hayat, M., Cairns, A., Dixon, M.F., O'Mahony, S., *Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human duodenum: what is normal?* J Clin Pathol, 2002. 55(5): p. 393-4.
- 51. Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, D.E., Spies, T., *A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(14): p. 6259-63.
- 52. Zwirner, N.W., Fernandez-Vina, M.A., Stastny, P., *MICA, a new polymorphic HLArelated antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes.* Immunogenetics, 1998. 47(2): p. 139-48.
- 53. Bahram, S., *MIC genes: from genetics to biology.* Adv Immunol, 2000. 76: p. 1-60.
- 54. Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., Spies, T., *Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(22): p. 12445-50.
- 55. Zwirner, N.W., Dole, K., Stastny, P., *Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes.* Hum Immunol, 1999. 60(4): p. 323-30.
- 56. Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M.S., Riddell, S.R., Spies, T., *Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells.* Nat Immunol, 2001. 2(3): p. 255-60.
- 57. Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K.H., Spies, T., Broad tumorassociated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(12): p. 6879-84.
- 58. Steinle, A., Li, P., Morris, D.L., et al., *Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family.* Immunogenetics, 2001. 53(4): p. 279-87.
- 59. Holtmeier, W., Kabelitz, D., *gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses.* Chem Immunol Allergy, 2005. 86: p. 151-83.
- 60. Bauer, S., Groh, V., Wu, J., et al., *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA.* Science, 1999. 285(5428): p. 727-9.
- 61. Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B., et al., *An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10.* Science, 1999. 285(5428): p. 730-2.
- 62. Li, P., Morris, D.L., Willcox, B.E., Steinle, A., Spies, T., Strong, R.K., *Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA.* Nat Immunol, 2001. 2(5): p. 443-51.

- 63. Eagle, R.A., Trowsdale, J., *Promiscuity and the single receptor: NKG2D.* Nat Rev Immunol, 2007. 7(9): p. 737-44.
- 64. Groh, V., Wu, J., Yee, C., Spies, T., *Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation.* Nature, 2002. 419(6908): p. 734-8.
- 65. Robinson, J., Perez-Rodriguez, M., Waller, M.J., et al., *MICA sequences 2000.* Immunogenetics, 2001. 53(2): p. 150-69.
- 66. Tian, W., Cai, J., Liu, X., *MICA genetic polymorphism and HLA-A,C,B,MICA and DRB1* haplotypic variation in a southern Chinese Han population: identification of two new *MICA alleles, MICA*060 and MICA*062.* Hum Immunol, 2011. 72(6): p. 510-5.
- 67. Mizuki, N., Ota, M., Kimura, M., et al., *Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(4): p. 1298-303.
- 68. Rueda, B., Pascual, M., Lopez-Nevot, M.A., Gonzalez, E., Martin, J., *A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats.* Tissue Antigens, 2002. 60(6): p. 526-8.
- 69. Suemizu, H., Radosavljevic, M., Kimura, M., et al., *A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(5): p. 2971-6.
- 70. Dargemont, C., Le Bivic, A., Rothenberger, S., Iacopetta, B., Kuhn, L.C., *The internalization signal and the phosphorylation site of transferrin receptor are distinct from the main basolateral sorting information.* EMBO J, 1993. 12(4): p. 1713-21.
- 71. Keller, P., Simons, K., *Post-Golgi biosynthetic trafficking.* J Cell Sci, 1997. 110 (Pt 24): p. 3001-9.
- 72. Matter, K., Yamamoto, E.M., Mellman, I., *Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells.* J Cell Biol, 1994. 126(4): p. 991-1004.
- 73. Collins, R.W., Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. Eur J Immunogenet, 2004. 31(3): p. 105-14.
- 74. Kyte, J., Doolittle, R.F., *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.* J Mol Biol, 1982. 157(1): p. 105-32.
- 75. Bilbao, J.R., Martin-Pagola, A., Vitoria, J.C., Zubillaga, P., Ortiz, L., Castano, L., *HLA-DRB1 and MHC class 1 chain-related A haplotypes in Basque families with celiac disease.* Tissue Antigens, 2002. 60(1): p. 71-6.
- 76. Rueda, B., Pascual, M., Lopez-Nevot, M.A., et al., *Association of MICA-A5.1 allele with susceptibility to celiac disease in a family study.* Am J Gastroenterol, 2003. 98(2): p. 359-62.
- 77. Tinto, N., Ciacci, C., Calcagno, G., et al., *Increased prevalence of celiac disease without gastrointestinal symptoms in adults MICA 5.1 homozygous subjects from the Campania area.* Dig Liver Dis, 2008. 40(4): p. 248-52.
- 78. Lopez-Vazquez, A., Rodrigo, L., Fuentes, D., et al., *MHC class I chain related gene A* (*MICA*) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1*0501/DQB1*0201. Gut, 2002. 50(3): p. 336-40.
- 79. Fernandez, L., Fernandez-Arquero, M., Gual, L., et al., *Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene in celiac disease.* Tissue Antigens, 2002. 59(3): p. 219-22.
- 80. Woolley, N., Mustalahti, K., Maki, M., Partanen, J., *Cytokine gene polymorphisms and genetic association with coeliac disease in the Finnish population.* Scand J Immunol, 2005. 61(1): p. 51-6.
- 81. Eleme, K., Taner, S.B., Onfelt, B., et al., *Cell surface organization of stress-inducible proteins ULBP and MICA that stimulate human NK cells and T cells via NKG2D.* J Exp Med, 2004. 199(7): p. 1005-10.
- 82. Fullekrug, J., Simons, K., *Lipid rafts and apical membrane traffic.* Ann N Y Acad Sci, 2004. 1014: p. 164-9.
- 83. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(12): p. 5463-7.

- 84. Ota, M., Katsuyama, Y., Mizuki, N., et al., *Trinucleotide repeat polymorphism within exon* 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. Tissue Antigens, 1997. 49(5): p. 448-54.
- 85. Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stammati, A., Zucco, F., *The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics.* Cell Biol Toxicol, 2005. 21(1): p. 1-26.
- 86. Amasheh, M., Schlichter, S., Amasheh, S., et al., *Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells.* J Nutr, 2008. 138(6): p. 1067-73.
- 87. Chinnapen, D.J., Chinnapen, H., Saslowsky, D., Lencer, W.I., *Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER.* FEMS Microbiol Lett, 2007. 266(2): p. 129-37.
- 88. Schroeder, F., Holland, J.F., Bieber, L.L., *Fluorometric evidence for the binding of cholesterol to the filipin complex.* J Antibiot (Tokyo), 1971. 24(12): p. 846-9.
- 89. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
- 90. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Anal Biochem, 1985. 150(1): p. 76-85.
- 91. Moehle, C., Ackermann, N., Langmann, T., et al., *Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease.* J Mol Med (Berl), 2006. 84(12): p. 1055-66.
- 92. Lan, M.S., Batra, S.K., Qi, W.N., Metzgar, R.S., Hollingsworth, M.A., *Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA.* J Biol Chem, 1990. 265(25): p. 15294-9.
- 93. Allen, A., Hutton, D.A., Pearson, J.P., *The MUC2 gene product: a human intestinal mucin.* Int J Biochem Cell Biol, 1998. 30(7): p. 797-801.
- 94. Schuck, S., Simons, K., *Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane.* J Cell Sci, 2004. 117(Pt 25): p. 5955-64.
- 95. Stenmark, H., Olkkonen, V.M., *The Rab GTPase family.* Genome Biol, 2001. 2(5): p. REVIEWS3007.
- 96. Schluter, O.M., Schmitz, F., Jahn, R., Rosenmund, C., Sudhof, T.C., *A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function.* J Neurosci, 2004. 24(29): p. 6629-37.
- 97. Lin, C.G., Lin, Y.C., Liu, H.W., Kao, L.S., *Characterization of Rab3A, Rab3B and Rab3C: different biochemical properties and intracellular localization in bovine chromaffin cells.* Biochem J, 1997. 324 (Pt 1): p. 85-90.
- 98. Hoekstra, D., Tyteca, D., van, I.S.C., *The subapical compartment: a traffic center in membrane polarity development.* J Cell Sci, 2004. 117(Pt 11): p. 2183-92.
- 99. Evans, C.M., Williams, O.W., Tuvim, M.J., et al., *Mucin is produced by clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. 31(4): p. 382-94.
- 100. Weber, E., Berta, G., Tousson, A., et al., *Expression and polarized targeting of a rab3 isoform in epithelial cells.* J Cell Biol, 1994. 125(3): p. 583-94.
- 101. Asano, M., Komiyama, K., *Polymeric immunoglobulin receptor.* J Oral Sci, 2011. 53(2): p. 147-56.
- 102. McMahon, H.T., Boucrot, E., *Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. 12(8): p. 517-33.
- 103. Bastiani, M., Parton, R.G., Caveolae at a glance. J Cell Sci, 2010. 123(Pt 22): p. 3831-6.

7 Anhang

Eidesstattliche Versicherung

"Ich, Sarah Nadine Kamel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema "Subzelluläre Lokalisation von MICA in Abhängigkeit vom MICA-Genotyp bei Zöliakie' selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" des ICMJE -*www.icmje.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst."

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Sarah Nadine Kamel hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Schumann M, Kamel S, Pahlitzsch ML, Lebenheim L, May C, Krauss M, Hummel M, Daum S, Fromm M, Schulzke JD., *Defective tight junctions in refractory celiac disease.*, Ann N Y Acad Sci. 2012 Jul;1258:43-51.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung von Immunfluoreszenzfärbungen an intestinalen Biopsien von Patienten mit refraktärer Zöliakie.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationen

Schumann M, Kamel S, Pahlitzsch ML, Lebenheim L, May C, Krauss M, Hummel M, Daum S, Fromm M, Schulzke JD., Defective tight junctions in refractory celiac disease., Ann N Y Acad Sci. 2012 Jul;1258:43-51.

Danksagung

Ich bedanke mich bei dem gesamten Laborteam, bei meinen Freunden und Verwandten, ohne die die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt

PD Dr. med. Severin Daum für die Hilfsbereitschaft und die zahlreichen freundlichen und schnellen Antworten auf alle Fragen,

meiner Familie für das Lektorat, die finanzielle und emotionale Unterstützung, Gotlind Kellner für das Lektorat,

Prof. Dr. rer. nat. Tobias Lenz für die technische Hilfe,

Prof. Dr. med. Christoph Loddenkemper und Simone Spiekermann für die Hilfe bei den Immunhistochemie-Färbungen,

Piotr Lukasik für die Hilfe bei den Abbildungen und die emotionale Unterstützung, Claudia May für die Anleitung und Hilfe im Labor, die freundlichen Antworten auf meine unzähligen Fragen und die schöne Zeit im Labor,

Sina Niklas für die Freundschaft und die zahllosen Stunden mit emotionaler und fachlicher Unterstützung,

Sarina Richter für die Anleitung und Hilfe im Labor, all die Mühen, Antworten, Stunden und den Spaß bei der Sequenzierung,

Elisabeth Rust für die ständige Inspiration und die Geduld für lange Diskussionen und Dr. med. Michael Schumann für die gute Betreuung der Arbeit.