

Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Aus der Medizinischen Klinik I Gastroenterologie / Infektiologie / Rheumatologie
Direktor: Prof. Dr. med Martin Zeitz

**Expression von CD44 Varianten Isoformen
und des Liganden Osteopontin
bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
Charité – Universitätsmedizin Berlin

vorgelegt von: Elianne Kassi
aus Kamerun

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Bianca Wittig
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Heiko Witt

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 01.06.2008

Meinen lieben Eltern, Martine Youdou und Sakaria Tchantchou, gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	iv
1 Einleitung.....	1
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	1
1.1.1 <i>Definition und Epidemiologie.....</i>	<i>1</i>
1.1.2 <i>Ätiologie und Pathogenese</i>	<i>2</i>
1.1.3 <i>Klinik und Verlauf.....</i>	<i>3</i>
1.1.4 <i>Diagnostik und Therapie</i>	<i>6</i>
1.2 Immunkompetente Zellen in der Darmflora / Zelloberflächenmarker.....	7
1.2.1 <i>Struktur des intestinalen Immunsystems.....</i>	<i>7</i>
1.2.2 <i>CD44 und sein Ligand Osteopontin: Struktur und Genetik.....</i>	<i>8</i>
1.3 CD44 und Osteopontin bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ..	11
1.3.1 <i>Stand des Wissens</i>	<i>11</i>
1.3.2 <i>Motivation.....</i>	<i>13</i>
1.4 Hypothese und Ziel der Arbeit.....	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Untersuchungsgut	15
2.1.1 <i>Patienten- und Probandenkollektiv.....</i>	<i>15</i>
2.1.2 <i>Probengewinnung und Aufbereitung.....</i>	<i>17</i>
2.1.3 <i>Immunfluoreszenzfärbung der Zelloberflächenmoleküle.....</i>	<i>19</i>
2.2 Analysen	21
2.2.1 <i>Untersuchungsmethoden.....</i>	<i>21</i>

2.2.2	<i>Durchführung und Auswertung der Messungen</i>	23
3	Ergebnisse	27
3.1	Expression von CD44 auf peripheren Blutlymphozyten	27
3.1.1	<i>Detektion verschiedener Epitope von CD44-Standard</i>	27
3.1.2	<i>Oberflächenexpression der CD44 Varianten Isoformen</i>	28
3.2	Osteopontin.....	33
3.2.1	<i>Expression von Osteopontin</i>	33
3.2.2	<i>Abhängigkeit von der Art der Erkrankung</i>	35
3.2.3	<i>Einfluss der Krankheitsaktivität</i>	37
3.2.4	<i>Sekretion von Osteopontin durch verschiedene Zelltypen</i>	39
3.3	Kostimulatorische Funktion von Osteopontin	40
4	Diskussion	43
4.1	Expression der CD44-Varianten auf peripheren Blutlymphozyten	43
4.2	Expression von Osteopontin auf peripheren Blutlymphozyten	48
4.3	Osteopontinkonzentration im Serum und Art der Erkrankung	49
4.4	Osteopontin als kostimulatorisches Molekül bei CED	51
4.5	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	52
5	Zusammenfassung	55
	Literaturverzeichnis	57
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	69
	Anhang	73
	A-I Werte der Oberflächenexpression auf peripheren Blutlymphozyten bei Morbus Crohn Patienten	73

A-II Werte der Oberflächenexpression auf peripheren Blutlymphozyten bei Colitis ulcerosa Patienten	76
A-III Werte der Oberflächenexpression auf peripheren Blutlymphozyten bei gesunden Probanden.....	79
Eidesstattliche Erklärung.....	81
Danksagung	83
Lebenslauf.....	85

Abkürzungsverzeichnis

-/-	Knock out
AS	Aminosäure
CAI	Colitis Activity Index
CD	Cluster of Differentiation
CD44s	CD44-Standard
CD44v	CD44 Variante Isoformen
CDAI	Crohn Disease Activity Index
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen
CU	Colitis ulcerosa
DZ	Dendritische Zellen
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Koloniestimulierender Faktor
IL	Interleukin
INFγ	Interferon γ
LPMZ	Lamina Propria Mononukleäre Zellen
MAK	Monoklonaler Antikörper
MC	Morbus Crohn
OPN	Osteopontin
PBA	Phosphat Buffer Albumin
PBMZ	Periphere Blut Mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat Buffer Saline
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumjodid
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TH-Zellen	T-Helferzellen
TNBS	Trinitrobenzensulfonsäure
TNFα	Tumor Nekrose Factor α

1 Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Unter der allgemeinen Bezeichnung „Chronisch entzündliche Darmerkrankungen“ (CED) werden entzündliche Störungen des Gastrointestinaltraktes (GIT) unbekannter Ursache zusammengefasst. Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) stellen die klinisch-histologisch definierten Hauptformen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen dar. Beide Erkrankungen unterscheiden sich durch ihre Lokalisation und die Art ihrer Ausbreitung. Während sich Morbus Crohn im gesamten Gastrointestinaltrakt ausbreiten kann, beschränkt sich die Colitis Ulcerosa auf die Mukosa des Dickdarms und breitet sich, ausgehend vom Rektum, kontinuierlich entlang des Kolons oralwärts aus (Tabelle 1).

Der Häufigkeitsgipfel chronisch entzündlicher Darmerkrankungen liegt zwischen dem 20. und dem 30. Lebensjahr. Die Inzidenz und die Prävalenz dieser Erkrankungen zeigen nur geringe Unterschiede: Die Inzidenz bzw. die Prävalenz der Colitis ulcerosa liegt bei 8 - 10/100 000 Einwohner pro Jahr bzw. bei 70 - 150/100 000 Einwohner pro Jahr. Bei Morbus Crohn liegt die Inzidenz bei 2/100 000 Einwohner pro Jahr und Prävalenz bei 20 – 40/100 000 Einwohner pro Jahr in West Europa und den USA (Munkholm *et al.* 1992).

Es gibt allerdings regionale und ethnische Unterschiede in der Inzidenz: So treten chronisch entzündliche Darmerkrankungen häufig in westlichen Ländern auf. In den achtziger Jahren wurde beispielsweise eine steigende Inzidenz in Westeuropa beschrieben (Piront *et al.* 2002). Die Prävalenz in Industrieländern liegt bei ca. 0,5%

und es wird angenommen, dass die weiße Bevölkerung – insbesondere die Juden – etwa viermal häufiger erkranken als die schwarze und die asiatische Bevölkerung (Kasper et al. 2005).

Tabelle 1: Unterscheidungsmerkmale zwischen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn

Differentialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED)		
Zeichen	Colitis ulcerosa	M. Crohn
Klinisch		
- Rektalblutung	häufig	selten
- Fistelbildungen	selten	häufig
- Abszesse, perianal, perirektal	gelegentlich	häufig
- Toxisches Megakolon	gelegentlich	selten
Endoskopisch		
- distaler Rektum betroffen	100% Ausbreitung	segmental
- Kontaktempfindlichkeit der Mukosa	häufig	selten
Pathologie		
- Tiefe des Befalls	Mukosa und Submukosa	Transmural
- Granulome	selten	häufig
- Fissuren, Fisteln	selten	häufig
- Mesenter. Lymphknoten	nicht befallen	ödematös, hyperplastisch

Zusammenfassende Darstellung der klinischen, bildgebenden und pathologischen Merkmale von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn. Modifiziert nach Herold (Herold 2007).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist bisher unklar und wird von endogenen, exogenen und genetischen Faktoren beeinflusst (Isselbacher et al. 1995). Als exogene Faktoren werden bakterielle Infektionen vermutet. Obwohl die intestinale Darmflora eine Rolle zu spielen scheint, konnten bisher keine definierten Keime nachgewiesen werden. Im Tiermodell zeigte sich, dass die bakterielle Darmbesiedlung wesentlich zur Entwicklung einer chronisch entzündlichen

Darmerkrankung beiträgt: experimentelle Kolitiden können in Modellen aus keimfreier Tierhaltung nicht induziert werden (Elson *et al.* 1995).

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind durch ein erhöhtes lymphozytäres und granulozytäres Infiltrat der Darmschleimhaut charakterisiert, Übersicht in: (Duchmann *et al.* 1999). Dies beruht auf einer wahrscheinlich gestörten mukosalen Toleranz und einer Immunreaktion auf luminale Antigene. Es folgt eine Produktion sowohl von pro-entzündlichen Zytokinen (IL1, IL6 und TNF α) als auch von regulatorischen Zytokinen wie TGF- β und IL10. Es kommt zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen in Richtung Entzündung, zu einer gesteigerten Permeabilität im Darmepithel und letztlich zum Verlust der Schutzfunktion (Oriishi *et al.* 1995).

In einer tierexperimentellen Studie kam es bei genveränderten Mäusen mit IL2-Defizienz zu Colitis ulcerosa ähnlichen Erkrankungen, während sich bei IL10-defizienten Mäusen eine Morbus Crohn ähnliche, chronische Enterokolitis zeigte (Kuhn *et al.* 1993; Sadlack *et al.* 1993). Durch immunologische Nachweismethoden konnte bei Morbus Crohn Patienten eine erhöhte IFN γ -Konzentration und bei Colitis ulcerosa Patienten ein Überschuss an IL5 in entzündeten Darmabschnitten gezeigt werden (Fuss *et al.* 1996; Parronchi *et al.* 1997). Dies deutet auf ein Ungleichgewicht in der Immunantwort der verschiedenen TH-Zellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hin: So scheint die TH1-Immunantwort bei Crohn Patienten eine besondere Rolle zu spielen, im Gegensatz zur TH2-Immunantwort bei Colitis Patienten. Es wird daher versucht, therapeutisch durch Immunmodulation das Gleichgewicht wiederherzustellen.

1.1.3 Klinik und Verlauf

Charakteristisch für Morbus Crohn ist die segmentale und diskontinuierliche granulomatöse Entzündung, die alle Wandschichten angreift und sich im gesamten Gastrointestinaltrakt ausbreiten kann (Abbildung 1). Die Erkrankung verläuft

schubweise. Leitsymptome sind krampfartige Bauchschmerzen und Diarrhöe, mit wenig oder gar keiner Blutbeimengung. Oft wird ein Schub von Fieber, Gewichtsverlust und extraintestinalen Symptomen begleitet. Lokalisation und Ausmaß der Entzündung prägen das klinische Bild der Erkrankung. Es wird zwischen folgenden Erscheinungsbildern unterschieden:

- Akuter Schub: kann leicht, mäßig oder schwer sein und ist gekennzeichnet durch Fieber oder subfebrile Temperaturen und erhöhte Entzündungszeichen (BSG, CRP, Thrombozyten und Leukozyten).
- Chronisch aktiver Verlauf: gekennzeichnet durch eine Persistenz der Symptome über sechs Monate mit anhaltend pathologischen Laborparametern.
- Remission: Normalisierung der Laborparameter und der Klinik.

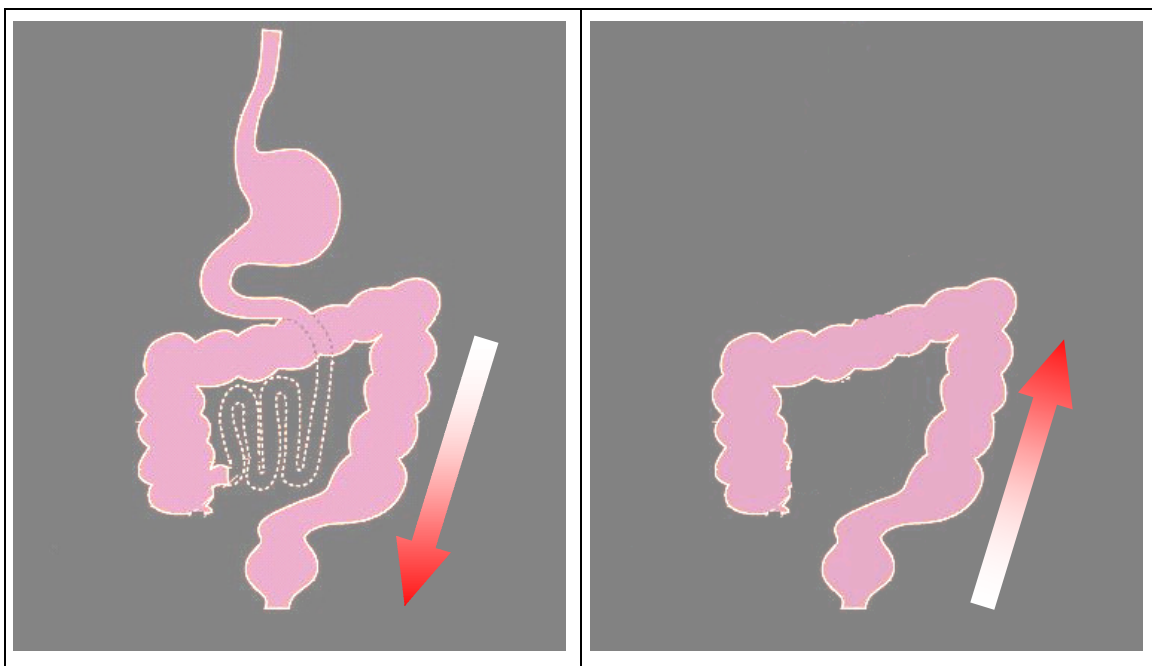


Abbildung 1: Links: Befallsmuster bei Morbus Crohn mit Ausdehnung von proximal nach distal. Rechts: Befallsmuster bei Colitis ulcerosa mit Ausdehnung im Kolon von distal nach proximal.

Neben dieser Einteilung können nach eingetretenen Komplikationen unterschiedliche Verläufe beobachtet werden: ein chronisch-entzündlicher Verlauf

bei persistierender, entzündlicher Aktivität, bei Fistelbildung oder Stenose bzw. ein fistulierender bzw. stenosierender Verlauf. Trotz dieser Einteilung ist es schwierig, eine eindeutige Korrelation zwischen Klinik und histologischem bzw. endoskopischem Befund zu etablieren. Deshalb wird heutzutage der Schweregrad der Erkrankung mit Hilfe des Crohn Disease Activity Index (CDAI) – zum ersten Mal von Best und Mitarbeitern entwickelt (Best *et al.* 1979) – angegeben. Dabei werden die Stuhlfrequenz, das Ausmaß der auftretenden Bauchschmerzen, das Allgemeinbefinden, der körperliche Untersuchungsbefund und die extraintestinalen Manifestationen (EIM) berücksichtigt. Es werden folgende Klassen unterschieden:

- Geringere Aktivität: CDAI < 150
- Mittelschwere Aktivität: 150 < CDAI < 350
- Starke Aktivität: CDAI > 350

Während bei Morbus Crohn alle Wandschichten betroffen sind, wird bei der Colitis ulcerosa eine kontinuierliche Entzündung der Kolonschleimhaut (Mucosa und Submucosa) mit Ulzeration beobachtet (Abbildung 1). Als Hauptsymptome werden blutige Diarrhöen, Tenesmen und Schmerzen im linken abdominalen unteren Quadranten angegeben. Die Symptomatik und der Verlauf hängen sehr stark vom Ausbreitungsgrad der Erkrankung zum Zeitpunkt der ersten Manifestation ab. Eine Proktitis als erste Manifestation bleibt meist auch im weiteren Verlauf auf das Rektum beschränkt und verursacht leichtere Schmerzen. Dagegen führt eine Pancolitis als erste Manifestation zu einem schweren Verlauf mit möglicher Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms. Das Karzinomrisiko beträgt nach 20 Jahren Erkrankung 7,2% und nach 30 Jahren Erkrankung 16,5% (Ekbohm *et al.* 1990). In einer Meta-Analyse berichteten Jess und Mitarbeiter ebenfalls über ein erhöhtes Karzinomrisiko bei Morbus Crohn Patienten (Jess *et al.* 2005). Außerdem können das toxische Megakolon und Darmperforationen als Komplikationen auftreten.

Ähnlich wie bei Morbus Crohn wird die Aktivität der Colitis ulcerosa anhand eines klinischen Index, des sogenannten Colitis Activity Index (CAI) nach Rachmilewitz beurteilt (Rachmilewitz 1989). Dieser Index berücksichtigt die Stuhlfrequenz, die Blutungsintensität, das Fieber, den Hämoglobin- und Albumingehalt im Blut, sowie die Blutsenkungsgeschwindigkeit. Es werden folgende Klassen unterschieden:

- Geringe Aktivität: CAI < 4
- Mittelschwere Aktivität: 5 < CAI < 10
- Starke Aktivität: CAI >10

1.1.4 Diagnostik und Therapie

Beim Vorliegen der Leitsymptome chronisch entzündlicher Darmerkrankungen müssen mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt werden, um infektiöse Ursachen auszuschliessen. Als nächster Schritt werden eine Rektoskopie und eine Kolo-Ileoskopie mit Stufenbiopsien durchgeführt. Zu weiteren diagnostischen Maßnahmen gehören die Sonographie zum Nachweis möglicher Abszesse oder umschriebener Wandverdickungen, sowie das Röntgen des Dünndarmes (Enteroklysma nach Sellink) oder die Gastroskopie bei Verdacht auf Morbus Crohn. Heutzutage können auch die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie des Dünndarmes weitere wertvolle Hinweise auf Abszesse und Entzündungen liefern.

Laborchemisch gibt es keine spezifischen Parameter. Die Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CRP), der Gamma Glutamyltransferase, der Alkalischen Phosphatase (AP), der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und des Blutbildes (BB) können hilfreich sein, um die Aktivität der Erkrankung zu bestimmen und eventuelle Komplikationen einzuschätzen. Eine weitere diagnostische Hilfe kann die Bestimmung von Autoantikörpern im Blut wie z.B. perinukleäre antineutrophile zytoplasmatische Antikörper (pANCA) und Anti-Saccharomyces–Cerevisiae-

Antikörper (ASCA) sein. Nur das Vorkommen dieses Antikörpers führt zu keiner Diagnose.

Ziel der Therapie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist es, das Gleichgewicht des Immunsystems wiederherzustellen. Eine Heilung kann durch operative Maßnahmen bei Morbus Crohn nicht erreicht werden und bei der Colitis ulcerosa nur durch Rezession des Kolons. Daher spielt die konservative Therapie eine wichtige Rolle in der Behandlung.

Die derzeitige Therapie beider Erkrankungen umfasst die Anwendung sowohl von Aminosalicylaten als auch von Steroiden und nicht biologischen Immunsuppressoren. Diese Therapiemöglichkeiten sind für die meisten Patienten wirksam. Es gibt jedoch Patienten, die therapieresistent sind. Daher werden neue Therapieansätze entwickelt, die auf Antikörper-Rekombinanten Oligonukleotiden und auf der Inhibition von kostimulatorischen Molekülen basieren. Ziel dabei ist, in die Entzündungskaskade einzugreifen und das Gleichgewicht im Darm wieder herzustellen (Wittig *et al.* 2005).

1.2 Immunkompetente Zellen in der Darmflora / Zelloberflächenmarker

1.2.1 Struktur des intestinalen Immunsystems

Das intestinale Immunsystem steht im ständigen Kontakt mit potentiellen Krankheitserregern der Darmflora und Antigenen der Nahrung. Der Gastrointestinaltrakt stellt daher das größte immunologische Organ des Körpers dar. Um den Organismus gegen pathogene Keime und Antigene zu schützen, besitzt das intestinale Immunsystem eine hohe Selektivität. Diese Selektivität basiert auf lokalen, sowohl immunologischen als auch nicht immunologischen Prozessen und wird als intestinale mukosale Barriere beschrieben (Schreiber und Walker 1988).

Histologisch besteht das intestinale Immunsystem aus schleimhautassoziiertem lymphatisches Gewebe – Mucosa associated lymphoid tissue (MALT). Dazu gehört das Immunsystem des Darmes – Gut associated lymphoid tissue (GALT). Das GALT besteht aus verschiedenen immunkompetenten Zellen wie Makrophagen, Mastzellen und Plasmazellen. Diese Zellen sind in der Lamina propria des Darmes und intraepithelial zwischen den Enterozyten vorzufinden. Weitere immunkompetente Zellen sind B- und T- Zellen, die in den Peyer'schen Plaques lokalisiert sind und über Microfold-Zellen (M-Zellen) Kontakt zum Intestinallumen haben (Brandtzaeg *et al.* 1987). Die humorale Immunantwort des MALT basiert auf der Synthese von sekretorischen Antikörpern (Immunglobulin A).

1.2.2 CD44 und sein Ligand Osteopontin: Struktur und Genetik

CD44

Das Molekül CD44 wurde zum ersten Mal von Dalchau und Mitarbeitern in den achtziger Jahren beschrieben (Dalchau *et al.* 1980). CD44 stellt eine Familie von membrangebundenen Glykoproteinen – Adhäsionsmolekülen – dar, die ubiquitär vorkommen und verschiedene Isoformen aufweisen. Die Isoformen unterscheiden sich durch ihre Struktur und Funktion (Naor *et al.* 1997). Beim Menschen ist CD44 auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11p13 codiert und enthält ca. 20 Exons (Abbildung 2). Die ersten fünf Exons codieren die extrazelluläre Domäne und sind für alle CD44-Moleküle gleich. Die nächsten zehn Exons (6-15) dienen der Herstellung verschiedener Varianten (CD44v) durch alternatives Spleissen der mRNA: v1 für Exon 6 bis v10 für Exon 15 (Tolg *et al.* 1993). Diese Varianten haben ein Molekulargewicht zwischen 120 und 200 kDa und sind durch lange und stark glykosylierte Aminosäureketten gekennzeichnet.

Die ubiquitär vorkommende Isoform ist CD44 Standard (CD44s), die keine variable Region trägt. CD44s entsteht durch posttranslationale Modifikationen (N- und O- Glykosylierung) eines 37 kDa grossen Moleküls. Dies führt zu einem Endmolekulargewicht von ca. 90 kDa. Die Anlagerung von Chondroinsulfat an das

Glykoprotein führt zu einem Molekulargewicht von 180-200 kDa (Denning *et al.* 1995). CD44s ist ein Molekül mit 363 Aminosäuren (AS), die drei verschiedene Regionen bilden: 72 AS in der intrazellulären, 21 AS in der transmembranen und 270 AS in der extrazellulären Domäne.

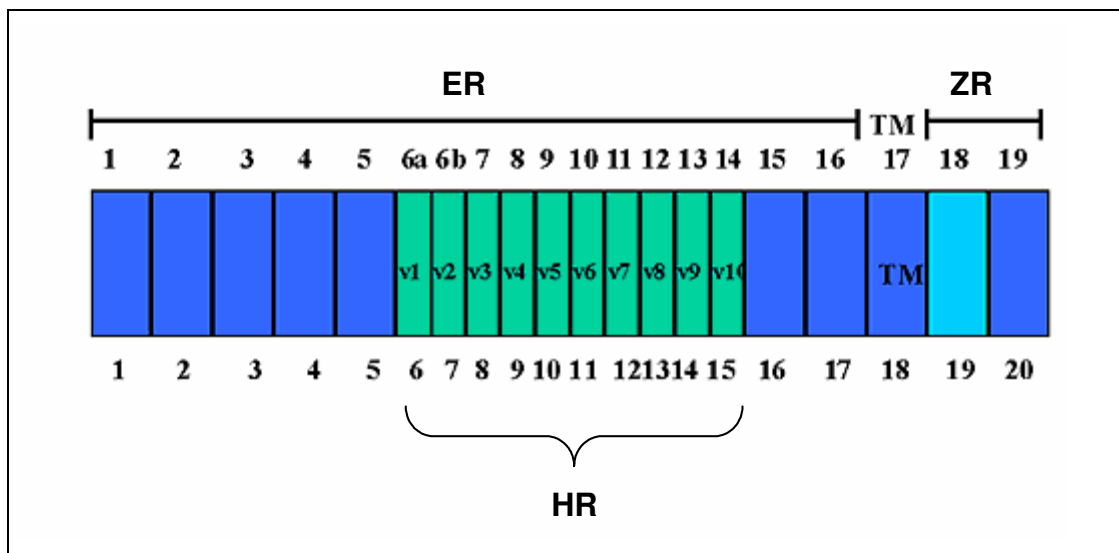


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Genstruktur von CD44 modifiziert nach Godison *et al.* Durchnummeriert sind die Exons. ER: Extrazelluläre Region, TM: entspricht der transmembranen Domäne. ZR: Zytoplasmatische Region. HR: Hypervariable Region.

In der Vergangenheit zeigten Cichy und Pure (Cichy und Pure 2003), dass CD44s zum einem als lösliches Molekül aber auch als transmembraner Zellrezeptor exprimiert werden kann. Es wird ausser auf Thrombozyten von allen Blutzellreihen exprimiert. Im Gegensatz zu CD44s ist die Expression der Varianten Isoformen auf bestimmten Zellen (aktivierte epitheliale Zellen, endotheliale Zellen, aktivierte Leukozyten und maligne Zellen) beschränkt. Diese Varianten Isoformen übernehmen dort eine Funktion der Kostimulation (Mackay *et al.* 1994). Das Molekül CD44 scheint eine wichtige Funktion in verschiedenen biologischen Prozessen zu spielen. Diese Funktion kann auf die Vielfältigkeit seiner isoformen Varianten und seine Fähigkeit, sich an verschiedene Moleküle wie Fibronectin, Kollagen, Laminin und Osteopontin zu binden, zurückgeführt werden (Weber *et al.* 1996).

Osteopontin

Osteopontin (OPN), auch als Eta-1 (Early T-lymphocyte activation-1) bekannt, ist ein Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa. Dieses Molekül wurde in den 60er Jahren durch Proteinfractionierung aus Rinderknochen entdeckt und von Herring und Mitarbeitern beschrieben (Herring und Kent 1963; Herring 1976). Beim Menschen ist Osteopontin auf Chromosom ch49 codiert und besitzt verschiedene Bindungsdomänen (Abbildung 3).

Osteopontin wird als lösliches Molekül in Körperflüssigkeiten exprimiert und kann zusätzlich in der extrazellulären Matrix produziert werden. Es wird von verschiedenen Zelltypen wie aktivierten T-Zellen, Makrophagen, natürlichen Killerzellen und Epithelzellen sezerniert. Osteopontin gehört zu einer Proteinfamilie namens SIBLING (Small Integrin Binding Ligand N-Linked Glycoprotein (Fisher *et al.* 2001)), die an Integrine wie $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ binden und deren Gene in Knochen und Zähnen ähnlich exprimiert werden (Chabas 2005). Die $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -OPN-Bindung wird beeinflusst vom RGD-Motiv (Arginin-Glutamin-Aspartat) und von der phosphorylierten Form von Osteopontin (Ashkar *et al.* 2000). Diese Bindung wirkt chemotaktisch auf Makrophagen, Endothelzellen und auf weiche Muskelzellen (Bendeck *et al.* 2000).

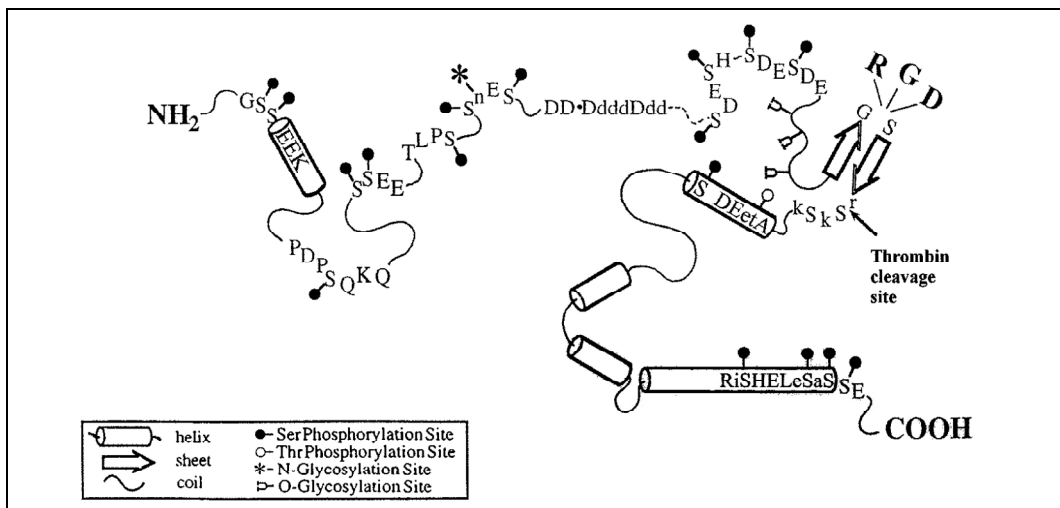


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur des Osteopontins modifiziert von Dehhardt und Mitarbeiter (Denhardt *et al.* 2001a) nach einer Darstellung von Sodek und Mitarbeiter (Sodek *et al.* 2000): Die Grossbuchstaben stellen die Aminosäure dar, während die Kleinbuchstaben für die konservierten Aminosäuren stehen. RGD: Arginin Glutamin Aspartat. NH₂: Aminoterminus; COOH: Carboxyterminus.

Unter Nutzung von bestimmten Domänen ($\beta 1$ Integrine) kann sich Osteopontin an die CD44 Varianten Isoformen CD44v6 und CD44v7 binden und somit eine Liganden-Funktion übernehmen (Katagiri *et al.* 1999). Die Bindung zwischen Osteopontin und CD44 wird unterschiedlich beschrieben: zum einen wird CD44 als Ligand der dephosphorylierten Form von Osteopontin eine pro-inflammatorische und chemotaktische Rolle zugesprochen (Weber *et al.* 1996; Ashkar *et al.* 2000). Als lösliches Protein oder auch im gebundenen Zustand an der extrazellulären Matrix ist Osteopontin in die Migration und Aktivierung von Makrophagen involviert (Weber *et al.* 2002). Es wurde gezeigt, dass die Bindung von Osteopontin an CD44 ausreicht, um Chemotaxis oder Adhäsion von Makrophagen zu induzieren (van Dijk *et al.* 1993; Weber *et al.* 1996).

Desweiteren berichten Zohar und Mitarbeiter über die Rolle des Proteinkomplexes OPN-CD44-ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) in der Migration und in Überlebensprozessen von Fibroblasten, aktivierten Makrophagen und metastasierenden Zellen (Zohar *et al.* 2000). So führt eine Aktivierung von Osteopontin durch GM-CSF Rezeptorwechselwirkung zum Überleben der Zelle durch Interaktion von Osteopontin mit CD44 und der damit verbundenen Induktion der PI_3K/Akt (Phosphatidyl Inositol Triphosphatkinase) Signal-Kaskade (Lin und Yang-Yen 2001). Weiterhin aktiviert Osteopontin dendritische Zellen und Makrophagen und induziert eine TH1- Immunantwort (Ashkar *et al.* 2000; Renkl *et al.* 2005). Analog dazu amplifiziert Osteopontin durch Kostimulation die CD3 vermittelte T-Zellproliferation (O'Regan *et al.* 1999), reguliert die CD40-Liganden-Expression auf CD3+ T-Zellen herauf und induziert die IFN- γ -Produktion (O'Regan *et al.* 2000).

1.3 CD44 und Osteopontin bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

1.3.1 Stand des Wissens

In den letzten Jahren wurde viel über die Wichtigkeit von CD44 und seinem Liganden Osteopontin berichtet. Im Vergleich zu gesunden Probanden wurde

gezeigt, dass die Varianten Isoformen CD44v6 und CD44v7 auf peripheren Blutlymphozyten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA), Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen stark exprimiert werden (Rosenberg *et al.* 1995; Camacho *et al.* 1999; Wittig *et al.* 1999).

Wittig und Mitarbeiter (Wittig *et al.* 1998) konnten verschiedene Funktionen der CD44 Varianten Isoformen nachweisen: Ein monoklonaler Antikörper gegen CD44v7 verhindert die Entwicklung der TNBS-induzierten Kolitis bei Wildtypmäusen. Als Mechanismus wurden eine vermehrte Apoptose von aktivierten T-Zellen und die Induktion antigenreaktiver, regulierender T-Zellen vermutet. Währenddessen scheinen monoklonale Antikörper gegen CD44v6 keinen Einfluss auf die Entwicklung der Erkrankung zu haben. Die Deletion des Exons für die Variante 7 führte zu einer deutlichen Linderung der TNBS-induzierten Kolitis. Bei CD44v7 Knock-out Mäusen (CD44v7^{-/-} Mäusen) wurden unter entzündlichen Bedingungen deutliche Veränderungen der Immunantwort im Vergleich zu Wildtypmäusen beobachtet (Schmits *et al.* 1997). Ebenso wurde eine Heilung der chronischen Enterokolitis am Tiermodell (IL10^{-/-} Mäuse) in Kombination mit einer Deletion von CD44v6 und CD44v7 beschrieben (Wittig *et al.* 2000).

Osteopontin wurde in den letzten Jahren oft im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen untersucht: Haupterkenntnisse dieser Untersuchungen weisen vorwiegend auf eine pro-inflammatorische Wirkung von Osteopontin hin. Pro-inflammatorisch führt Osteopontin zu einer Chemotaxis von T-Zellen und Makrophagen und zur Polarisation der TH1-Immunantwort und hemmt somit die TH2-Zytokin-Produktion. Ashkar und Mitarbeiter (Ashkar *et al.* 2000) zeigten, dass OPN^{-/-} Mäuse eine starke Beeinträchtigung der TH1-Immunantwort bei Entzündungen mit Herpes Simplex Virus (HSV) und *Listeria monocytogenes* aufweisen. In den letzten Jahren wurden ebenfalls zunehmend Beweise für die Rolle von Osteopontin in TH1 vermittelten Entzündungsprozessen evaluiert. So wird Osteopontin bei Gewebsverletzungen (Wang *et al.* 1998) und viralen oder bakteriellen Infekten (Patarca *et al.* 1993; Rollo *et al.* 2005) hochreguliert. Es wird aber auch eine anti-inflammatorische Wirkung von Osteopontin diskutiert, z.B. durch

Inhibition der NO-Synthese (Hwang *et al.* 1994) und durch Förderung des Überlebens von Knochenmark-Zellen bei Mäusen (Lin *et al.* 2000).

Zusätzlich zur vorher erwähnten Rolle bei akuten Entzündungen scheint Osteopontin ebenfalls in T-Zell vermittelten chronischen Inflammationen involviert zu sein. Daher ist die Bedeutung von Osteopontin in der Entstehung und Erhaltung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen von Interesse. Die dysregulierte Immunantwort gegen körpereigene Bakterien oder Nahrungsantigene spielt bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine entscheidende Rolle.

1.3.2 Motivation

Die bisher durchgeführten Studien weisen auf eine bedeutende Rolle des Moleküls CD44 und seines Liganden Osteopontin in Entzündungsprozessen sowohl am Tiermodell, als auch beim Menschen hin. Durch weiterführende Studien könnte geklärt werden, ob CD44 Variante Isoformen und der Ligand Osteopontin an der Immunantwort bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt sind und ob die Expression der verschiedenen Varianten Isoformen und des Liganden mit dem Krankheitsbild bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen korreliert.

Die Untersuchung der oben erwähnten Punkte könnte den Weg für eine mögliche Einführung eines CD44 Varianten Isoformen Antikörpers in die Klinik als spezifische Zielstruktur in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ebnen.

1.4 Hypothese und Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Expression der aktivierungsabhängigen CD44 Varianten Isoformen mit dem klinischen Verlauf bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen korreliert. Außerdem

wird postuliert, dass Osteopontin bei Morbus Crohn eine pro-inflammatorische Wirkung und somit eine Bedeutung in der TH1-Immunantwort aufweist.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher:

- die Expression von aktivierungsabhängigen CD44 Varianten Isoformen und deren Ligand Osteopontin an frisch isolierten und *in vitro* stimulierten mononukleären Zellen sowohl des peripheren Bluts als auch der Lamina Propria von Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa sowie von gesunden Probanden zu untersuchen und
- eine Korrelationsanalyse zwischen ermittelter Expression und Verlauf der Erkrankung durchzuführen.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgut

2.1.1 Patienten- und Probandenkollektiv

In die Studie wurden Patienten der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (Medizinische Klinik I) einbezogen (Tabelle 2). Die Patienten stellten sich ambulant oder stationär in der Klinik vor. Alle wurden über die Untersuchung aufgeklärt und willigten in deren Durchführung ein.

Zur Bestimmung der Korrelation zwischen der Expression der CD44 Varianten Isoformen, des Liganden Osteopontin und der Aktivität bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auf peripheren Blutlymphozyten wurden insgesamt zehn gesunde Probanden und 25 Patienten untersucht, die sich wie folgt zusammensetzten: 12 mit Morbus Crohn, unterteilt anhand ihrer Krankheitsaktivität, Erscheinungsbild und Therapie wie vorher beschrieben. Drei Patienten waren ohne Krankheitsaktivität, davon einer mit extraintestinalen Manifestationen (E.I.M.) und ein Patient mit Cholangiokarzinom; sieben Patienten hatten eine geringere bis mittelschwere Krankheitsaktivität, wovon zwei einen fistulirenden Verlauf aufwiesen. Von den 12 Patienten wurden sieben nicht behandelt, drei wurden mit einer Steroiddosis von 30 – 75 mg/Tag behandelt und zwei mit Azathioprin (2 mg/Kg Körpergewicht).

Die 13 Patienten mit Colitis ulcerosa wurden genauso anhand der Krankheitsaktivität und Therapie wie folgt unterteilt: Zehn Patienten mit geringer bis mittelschwerer Aktivität und drei mit starker Aktivität. In der Gruppe der Colitis ulcerosa waren neun Patienten unbehandelt, ein Patient wurde mit einer Steroiddosis

von 50 mg/Tag, drei Patienten wurden mit Azathioprin (2 mg/Kg Körpergewicht) und ein Patient mit Mesalazin (2 g/Tag) behandelt.

Für die Bestimmung der Osteopontinkonzentration im Serum, die Proliferationsuntersuchungen und die Western Blot Analysen wurden Proben von 56 Patienten verwendet, davon 33 mit Morbus Crohn (18 Patienten mit keiner bis geringerer Krankheitsaktivität, 15 Patienten mit einer mittelschweren bis stärkeren Aktivität) und 23 Patienten mit Colitis ulcerosa (4 Patienten mit keiner bis geringerer Krankheitsaktivität und 19 Patienten mit mittelschwerer bis stärkerer Aktivität).

Tabelle 2: Patientenkollektiv und Kontrollgruppen

	MC Patienten		CU Patienten		Gesunde Probande	Non-CED Kolitis Patienten
Parameter	<i>Oberflächenexpression</i>					
Anzahl (n)	12		13		10	-
Aktivitätsindex	CDAI<150 n=7	CDAI>150 n=5	CAI<4 n=7	CAI>4 n=6	-	-
Parameter	<i>OPN-Serum-Konzentration, Zellproliferation, Western-Blot-Analyse</i>					
Anzahl (n)	33		23		7	10
Aktivitätsindex	CDAI<150 n=18	CDAI>150 n=15	CAI<4 n=4	CAI>4 n=19	-	-

Verteilung nach Krankheitsgruppe und –aktivität der in der Studie berücksichtigten Patienten sowie der gesunden Probanden. MC: Morbus Crohn, CU: Colitis ulcerosa, CED: Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, CDAI: Crohn Disease Activity Index, CAI: Colitis Activity Index.

Als Kontrollgruppe wurden 17 Personen, unterteilt in 10 mit Kolitis anderer Ursache (Divertikulitis, Kolon irritable, ischämische Kolitis, Lymphozyten Kolitis) und sieben gesunden Probanden, untersucht. Das Alter bei Morbus Crohn Patienten lag

zwischen 18 und 70 Jahren, bei Colitis ulcerosa Patienten zwischen 18 und 69 Jahren und bei den gesunden Probanden zwischen 26 und 36 Jahren. Zusätzlich wurden sowohl den Patienten als auch den gesunden Probanden in den jeweiligen Gruppen Biopsien entnommen.

2.1.2 Probengewinnung und Aufbereitung

Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripheren Blut und aus der Lamina Propria

Den Patienten wurde Vollblut in Lithium-Heparin vorbehandelten Monovetten entnommen. Die Proben wurden innerhalb von zwei Stunden verarbeitet. Dabei wurde das Blut in Falcon-Röhrchen überführt und in gleichem Verhältnis mit Kulturmedium (Zusammensetzung: 10% fötales Kälberserum, Penicillin/Streptomycin, HEPES und Glutamin in RPMI 1640, Gibco, Paisley, Schottland) verdünnt. Die verdünnte Lösung wurde anschließend auf das gleiche Volumen Ficolltrennlösung (Biochrom, Berlin) geschichtet. Ficoll ist ein ungeladenes Sucrose-Polymer, dessen Dichte (1,077 g / ml) so eingestellt ist, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen die Ficollschicht passieren, Granulozyten in die Ficollphase eindringen und mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen) sich in der Interphase ansammeln (Abbildung 4). Es folgte eine 25-minütige Zentrifugation der Probe bei 320 x g bei Raumtemperatur (RT). Nach der Zentrifugation wurde die Interphase abgenommen und zweimal mit dem Kulturmedium gewaschen. Das gewonnene Pellet wurde im Kulturmedium resuspendiert und zur Stimulation und Färbung weiter verwendet.

Um Lamina Propria Monozytäre Zellen (LPMZ) zu gewinnen wurde die Darmschleimhaut aus Biopsien mehrfach in HBSS-Puffer gewaschen. Die Lamina Propria wurde durch Scherung getrennt und zerkleinert. Anschliessend erfolgte eine 30-minütige Inkubation in 0,5 M EDTA bei 4°C, um intraepitheliale Lymphozyten zu entfernen. Die Proben wurden während der Inkubation geschüttelt. Die gewonnenen

Zellen wurden dann zehn Minuten lang bei Raumtemperatur gewaschen und in HBSS-Puffer, versetzt mit 1 mg Kollagenase (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 200 µg Hyaluronidase (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und 100 µg DNase (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen getrennt und die Zellsuspension wurde zur Entfernung der Gewebereste durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 40 µm gegeben. Die Vitalität der Zellen wurde mittels Trypanblaufärbung bestimmt.

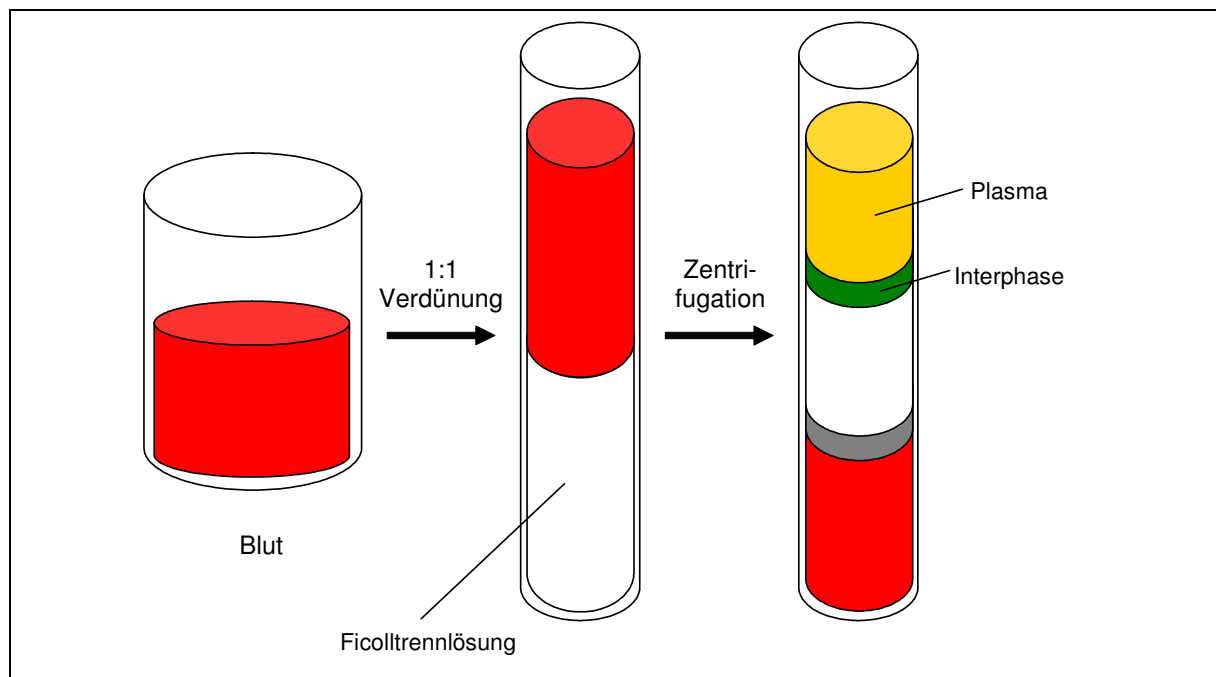


Abbildung 4: Prinzip der Ficol-Trennmethode: Aus Frischblut werden periphere Blutlymphozyten nach Zentrifugation von weiteren Blutbestandteilen (Granulozyten, Erythrozyten) getrennt und in der Interphase angesammelt.

Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzählung erfolgte am Lichtmikroskop mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (0,1 mm Kammertiefe) und einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Trypanblau färbt das Zytoplasma toter Zellen blau und grenzt sie dadurch für die Zellzählung von den lebendigen Zellen ab. Nach Zusammenführung von 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung wurde das Gemisch in die Zählkammer einpipetiert. Mit Hilfe des 40er Objektivs des Lichtmikroskops wurden 4 x 16 Felder der Neubauer-Kammer ausgezählt. Zur

Ermittlung der Zellzahl pro ml Zellsuspension wurde das Ergebnis der Zellzählung mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Anzahl der Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsstufe}$$

Stimulation

Zur mitogenen Stimulation wurden periphere Blutlymphozyten ($1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) in Kulturmedium (200 μ l/well) aufgenommen und mit 5 μ g/ml Phytohämagglutinin (PHA, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) stimuliert. Der Ansatz wurde 3 Tage im Brutschrank inkubiert. Die isolierten Lamina Propria Blut Monozytären Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und zur mitogenen Stimulation in einer 24-Wellplatte mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml und 5 μ g/ml PHA 24 Stunden kultiviert. Um Makrophagen zu gewinnen, wurden Monozyten durch Plastikadhäsion angereichert und mit 1 μ g/ml LPS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) drei Tage inkubiert.

Monozytäre Zellen (1×10^6 Zellen/ml) wurden mit 10 ng/ml GM-CSF (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und 100 ng/ml IL-4 (Chemicon, International, Temecula, CA, USA) zu dendritischen Zellen ausdifferenziert. Die Zellen wurden 7 Tage kultiviert. GM-CSF und IL-4 wurden am Tag 3 und Tag 5 zu den Zellen gegeben. Für Experimente zur Kreuz-Lymphozytenreaktion wurden dendritische Zellen zusätzlich mit und ohne Osteopontin (1 μ g/ml recombinant human osteopontin, Chemicon International, Temecula, CA, USA) und mit monozytenfreien PBMZ von einem allogenen Spender für weitere sieben Tage kultiviert.

2.1.3 Immunfluoreszenzfärbung der Zelloberflächenmoleküle

Antikörper

Verwendet wurden kommerziell erhältliche Anti-Human-Antikörper gegen die untersuchten CD44 Varianten Isoformen (CD44s, CD44v4, CD44v6, CD44v7,

Tabelle 3). Diese Antikörper sind bereits mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markiert und ermöglichen daher eine direkte Färbung. Weiterhin wurde der ebenfalls kommerziell erhältliche unkonjugierte Anti-Human-Antikörper gegen Osteopontin verwendet. Als Zweitantikörper und Isotypkontrolle wurden PE-markierte Anti-Maus-Antikörper verwendet. Als Isotypkontrolle für die CD44 Varianten Isoformen wurde ein FITC-markierter IgG1-Antikörper benutzt.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

	Klon	Markierung	Isotyp	Spezifität	Hersteller
Anti-human AK					
CD44s	SFF-2	FITC	Maus IgG1	HUMAN	Bender Med Systems, Wien, Österreich
CD44s	BU75	FITC	Maus IgG1	HUMAN	Ancell Corporation, Bayport, MN, USA
CD44s	A3D8		Maus IgG1	HUMAN	Sigma Aldrich, Missouri, USA
CD44v4	VFF-11	FITC	Maus IgG1	HUMAN	Bender Med Systems, Wien, Österreich
CD44v6	VFF-18	FITC	Maus IgG1	HUMAN	Bender Med Systems, Wien, Österreich
CD44v7	VFF-9	FITC	Maus IgG1	HUMAN	Bender Med Systems, Wien, Österreich
OPN	10A16		Maus IgG1	HUMAN	Biotrend Assay D., Köln, Deutschland
Isotypenkontrolle					
IgG1	MOPC-31C	FITC	Maus IgG1	Maus	BD, Bioscience, Heidelberg, Deutschland
--	Polyklonal	PE	Rabbit	Maus	Dako, Hamburg, Deutschland

Aufgelistet sind die Antikörper gegen die verschiedenen Oberflächenmoleküle. Einige verwendete Antikörper sind entweder mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) oder mit Phycoerythrin (PE) markiert.

Färbung naiver und stimulierter Monozyten

Die durch Plastikadhäsion isolierten Zellen ($1-2 \times 10^5/\text{ml}$) wurden in den Vertiefungen einer 96-Well-Rundbodenplatte verteilt (200 $\mu\text{l}/\text{well}$). Zur Blockade der Fc-Rezeptoren wurde 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Immunglobulin (Beriglobin, Aventis, Boehringer, Deutschland) für 10 min zur Zellsuspension gegeben, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern.

Die Zellen wurden in 100 μl PBA/well (Phosphat Buffer Albumin: 0,1% Rinderserumalbumin (BSA) in Phosphat gepufferter Saline (PBS)) gewaschen (200 x g, 5 Minuten, 4°C). Anschliessend wurden die Zellen mit dem ersten Antikörper in einer Konzentration von 1 $\mu\text{l}/100 \mu\text{l}$ für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Für den Nachweis von Osteopontin bzw. CD44s (Klon A3D8) wurden die Zellen erneut mit 100 μl PBA/well gewaschen und mit einem Sekundärantikörper mit einer Konzentration von 0.25 $\mu\text{l}/100 \mu\text{l}$ für weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert. Für die FACS-Analyse im Durchflusszytometer wurde das gewaschene Zellpellet in 300 μl PBA resuspendiert.

2.2 Analysen

2.2.1 Untersuchungsmethoden

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt ein Messverfahren zur quantitativen Bestimmung und zur Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom dar. Dabei werden mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff markierten Proben (z.B. Antikörper, Rezeptoren) bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene analysiert.

Carboxy Fluorescein diacetat Succinimidyl Ester (CFSE) Methode

Die CFSE-Methode ist ein Färbungsverfahren für vitale Zellen. Sie wird zur Bestimmung der Zellproliferation eingesetzt. Dabei dringt das CFSE in die Zellen ein und unterliegt einer Spaltung durch eine nicht spezifische Esterase. Proliferieren die Zellen, so wird die Menge an CFSE bei jeder Teilung halbiert. Dies führt zu einem Verlust an Fluoreszenzintensität, die an einem FACS-Gerät ermittelt werden kann.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay ist ein Testverfahren, das Antigen oder Antikörper mittels eines Enzym markierten Antikörpers (Konjugat) und einer dadurch katalysierten Färbereaktion quantitativ nachweist. Wichtig bei ELISA ist, dass die zu untersuchende Substanz mehr als eine Bindungsstelle für die Antikörper bereithält, weil das Antigen von beiden Seiten mit dem Antikörper besetzt sein soll. Die Oberfläche einer Mikrotiterplatte ist mit einem Überschuss an Antikörpern beschichtet, die gegen das zu ermittelnde Antigen gerichtet sind.

Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen und Waschen werden die Serumproben dazugegeben, um das darin enthaltene Antigen an den Antikörper zu binden. Als zweiter Schritt wird ein spezifisch gegen das Antigen gerichteter Antikörper hinzugefügt, der kovalent an ein Enzym gebunden ist. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung eines bestimmten Substrats zu einem messbaren Farbkomplex, das dann mit Hilfe eines Photometers quantitativ bestimmt wird. Durch gleichzeitige Messung der Extinktion bekannter Antigen-Konzentrationen und einer daraus erstellten Standardkurve kann dann die Antigen-Konzentration bestimmt werden.

2.2.2 Durchführung und Auswertung der Messungen

Nachweis von Zelloberflächenmarkern mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Die gefärbten Zellen wurden am Durchflusszytometer analysiert. Vor der Messung wurden die Zellen mit Propidiumjodid (PJ) in einer Konzentration von 1 µg/ml gemischt, um tote Zellen zu markieren. Propidiumjodid diffundiert bei toten Zellen durch die beschädigte Zellmembran und interkaliert zwischen der DNA Doppelhelix. Die Auswertung der Messdateien aus dem Durchflusszytometer erfolgte mit Hilfe der CellQuest Software (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Die statistische Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe des Students- T-Tests. Die statistische Signifikanz lag bei $p < 0.05$.

Nachweis von Osteopontin im Serum und in Zellkulturüberständen

Die Sekretion von Osteopontin wurde sowohl in Serumproben von Patienten als auch in Zellkulturüberständen von aktivierten PBMZ, LPMZ, Makrophagen und dendritischen Zellen untersucht. Die Bestimmung der Osteopontin-Konzentration erfolgte mittels eines im Handel erhältlichen Kits und dem dazugehörigen Protokoll (Human Osteopontin Enzyme Immunometric Assay Kit, Firma Assay Designs, Deutschland). Für jeden Assay wurden Proben mit definierten Osteopontin-Konzentrationen für eine Standardkurve eingesetzt. Die mit dem Photometer ermittelten Messwerte wurden dann mit Hilfe der Standardkurve in tatsächliche Osteopontin-Konzentrationen umgerechnet. Die statistische Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe des Students- T-Tests. Die statistische Signifikanz lag bei $p < 0.05$.

Nachweis von Osteopontin im Western Blot

Proteine aus peripheren Blutlymphozyten und Biopsien wurden mit Hilfe einer Trifast-Pufferlösung (10 mM TRIS-HCL PH 7.4, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1% Triton-X-100, ein Proteaseinhibitor-Gemisch; Boehringer, Mannheim, Deutschland)

extrahiert. Die Proteinkonzentration wurde dann mit Hilfe eines BCA-Protein-Assay-Kits (Pierce, Rockford, IL, USA) bestimmt. Die extrahierten Proteine wurden in gleichen Mengen mit einem Elektrophoresepuffer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und bei 100 °C für 1 min gekocht. Nach dem Kochen wurden die Proben auf ein 10% iges SDS–Page-Gel geladen und 90 min bei 120 –160 V elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen an eine Nitrozellulose-Membran (PVDF-Membran, Roth, Karlsruhe, Deutschland) gebunden.

Die freien Proteinbindungsstellen auf der Membran wurden mit einem Blockierungsreagenz auf Polymerbasis (Roti-Block) geblockt. Die PVDF-Membran wurde mit PBS/ 0.2% Tween gewaschen. Es folgte eine 90-minütige Inkubation mit einem Maus-anti-human-OPN-AK (Klon 10A16, Maus IgG Assay Designs Inc., Michigan, USA) in einer 1:10 Verdünnung. Nach 3-maligem Waschen wurde die PVDF-Membran mit einem Peroxidase – konjugiertem Ziege-Anti-Maus-IgG-AK (1:1000 verdünnt, DAKO, Hamburg, Deutschland) für 90 min inkubiert. Die Membran wurde erneut gewaschen und mit Roti-Lumen I & II (Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde ein Röntgenfilm entwickelt und ausgewertet.

Quantitative Bestimmung der Zellproliferation und Apoptose

Um die Zellproliferation zu untersuchen, wurden 1×10^7 Zellen/ml (DZ und T-Zellen, mit und ohne OPN-Inkubation) in 10 ml PBS resuspendiert und mit einer 10 μ M CFSE -Lösung (MoBitec, Göttingen Deutschland) versetzt. Die Zellen wurden für 10 min bei 37 °C inkubiert und mit je 5 ml PBS zweimal gewaschen. Die Zellen wurden anschliessend am Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung der Messdateien aus dem Durchflusszytometer erfolgte mit Hilfe der CellQuest Software.

Die Apoptose wurde durch den Nachweis hypodiploider Zellen nach der von Nicoletti beschriebenen Methode (Nicoletti *et al.* 1991) untersucht. Die Nicoletti-Analyse basiert auf einem prozentualen Nachweis apoptotischer fragmentierter Zellkerne durch Anfärbung der Zellen mit Propidiumjodid (PI, Sigma-Aldrich,

24

Deisenhofen). Die Zellen wurden in einer fluorochromen-hypotonen Lösung (50 µg/ml PI in 0.1% Natriumcitrat, 0.1% Triton X 100) für 12 Stunden bei 4°C im Dunkeln inkubiert und dann am Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung der Messdateien erfolgte ebenfalls mit Hilfe der CellQuest Software.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von CD44 auf peripheren Blutlymphozyten

3.1.1 Detektion verschiedener Epitope von CD44-Standard

Zur Detektion von CD44s wurden zunächst drei kommerziell erhältliche CD44s-Antikörper auf ihre Affinität sowohl vor als auch nach *in vitro* mitogener Stimulation getestet und verglichen (Abbildung 5). Dabei wiesen die drei CD44s-Antikörper (SFF-2, Bender Med Systems Wien, Österreich, A3D8, Sigma Aldrich, Missouri, USA, BU75, Ancell Corporation, Bayport, MN, USA) eine vergleichbare Affinität auf. Im naiven Zustand wurde bei allen drei getesteten Antikörpern eine Expression von CD44s von durchschnittlich 90% ermittelt. Als Folge der mitogenen Stimulation *in vitro* nahm die Frequenz positiver Zellen auf einen durchschnittlichen Wert von 60% ab. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im weiteren Verlauf nur einer der drei Antikörper (SFF-2) verwendet.

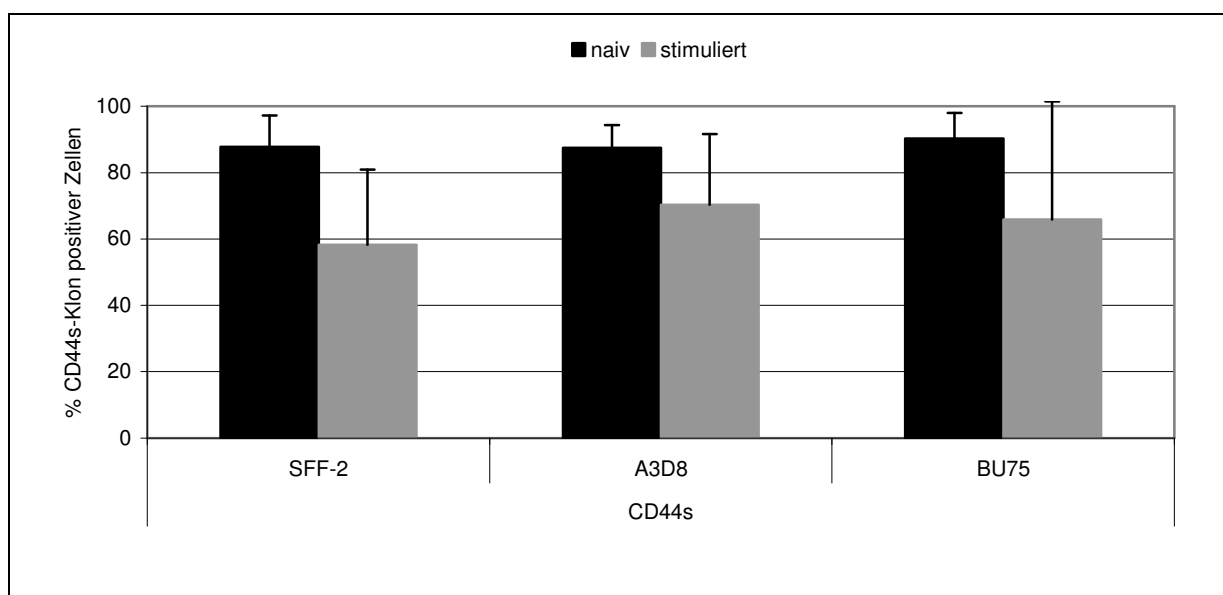


Abbildung 5: Gegenüberstellung der Oberflächenexpression drei verschiedener CD44-Standard Antikörper jeweils vor und nach mitogener Stimulation *in vitro* mit PHA.

3.1.2 Oberflächenexpression der CD44 Varianten Isoformen

Zur Ermittlung der Oberflächenexpression von CD44 auf peripheren Blutlymphozyten wurden die FACS-Analysen ausgewertet. Verglichen wurde die Expression von CD44s und der CD44 Varianten Isoformen CD44v4, CD44v6 und CD44v7 bei Patienten mit Morbus Crohn, bei Patienten mit Colitis ulcerosa und bei gesunden Probanden. Berücksichtigt wurde sowohl die spontane Expression (naiv), als auch die Expression nach Stimulation *in vitro*. Weiterhin wurde zwischen den Patienten im akuten und denjenigen im Remission-Zustand unterschieden. Die Oberflächenexpression von CD44s auf naiven Zellen von Morbus Crohn Patienten mit akutem Schub war signifikant geringer ($42\% \pm 25\%$) als bei Morbus Crohn Patienten im Remissionszustand ($86\% \pm 18\%$) (Abbildung 6). Die Expression auf naiven Zellen von gesunden Probanden zeigte keine signifikanten Unterschiede ($71\% \pm 21\%$) zu den Remissionspatienten.

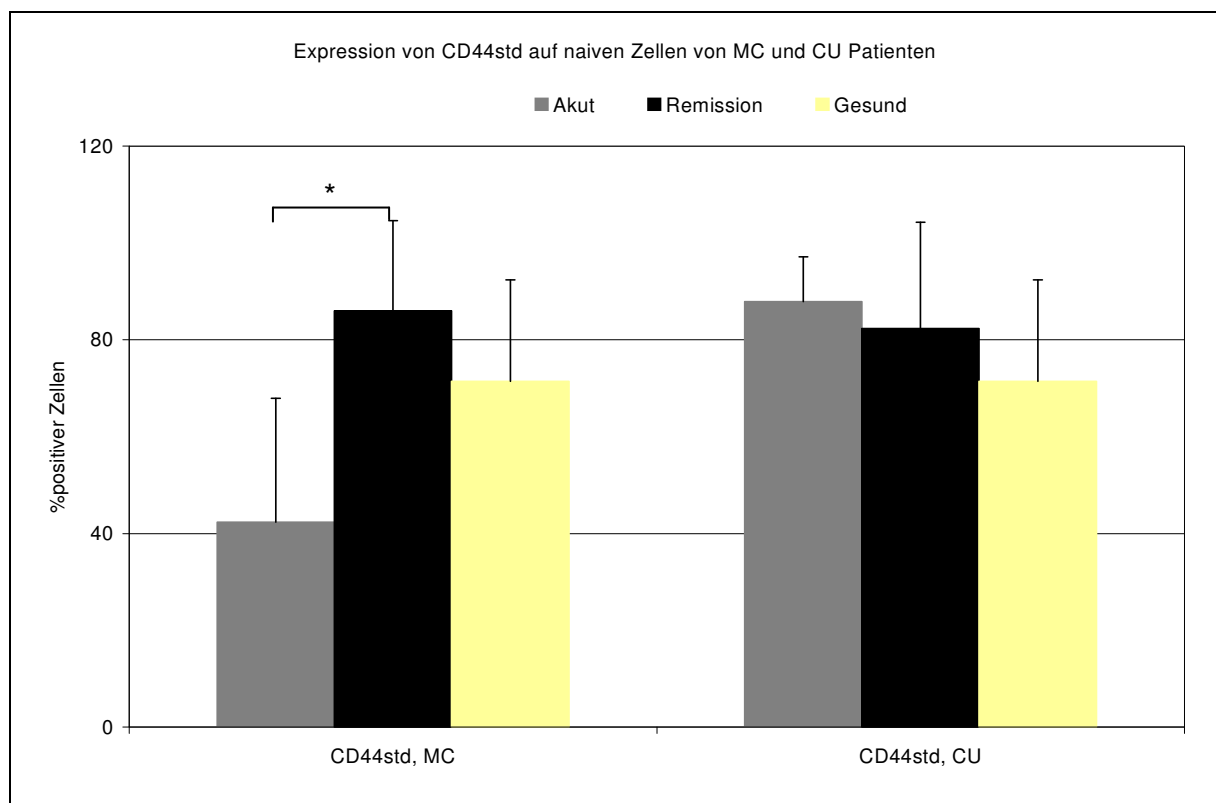


Abbildung 6: Oberflächenexpression von CD44-Standard auf naiven Zellen von MC und CU Patienten. Vergleich der Gruppen der Erkrankten (unterteilt in akuten und Remissionszustand) und der Gesunden. * $p=0.0067$.

Anders als bei den Patienten mit Morbus Crohn sieht das Verhältnis der Oberflächenexpression von CD44s auf naiven Zellen von Patienten mit Colitis ulcerosa aus: Colitis Patienten mit akutem Schub ($88\% \pm 9\%$) unterschieden sich hinsichtlich der Expression von CD44s nicht von denen im Remissionszustand ($82\% \pm 22\%$) bzw. von gesunden Probanden ($71\% \pm 21\%$). Im Gegensatz zu akuten MC-Patienten, deren CD44s Expression signifikant verringert war, konnten bei akuten CU-Patienten keine Unterschiede in der Expression detektiert werden (Abbildung 6).

Nach mitogener Stimulation der Zellen *in vitro* wurde sowohl bei den Patienten mit Morbus Crohn als auch bei denen mit Colitis ulcerosa im akuten, im Remissionszustand oder von gesunden Probanden kein signifikanter Unterschied in der Expression von CD44s beobachtet (Abbildung 7). Bei den Patienten mit Morbus Crohn im Remissionszustand lag die Frequenz positiver Zellen nach mitogener Stimulation der Zellen *in vitro* tendenziell unterhalb der Oberflächenexpression auf Zellen von gesunden Probanden. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa wurde ein nahezu gleiches Verhältnis der Expression vor und nach mitogener Stimulation der Zellen *in vitro* beobachtet.

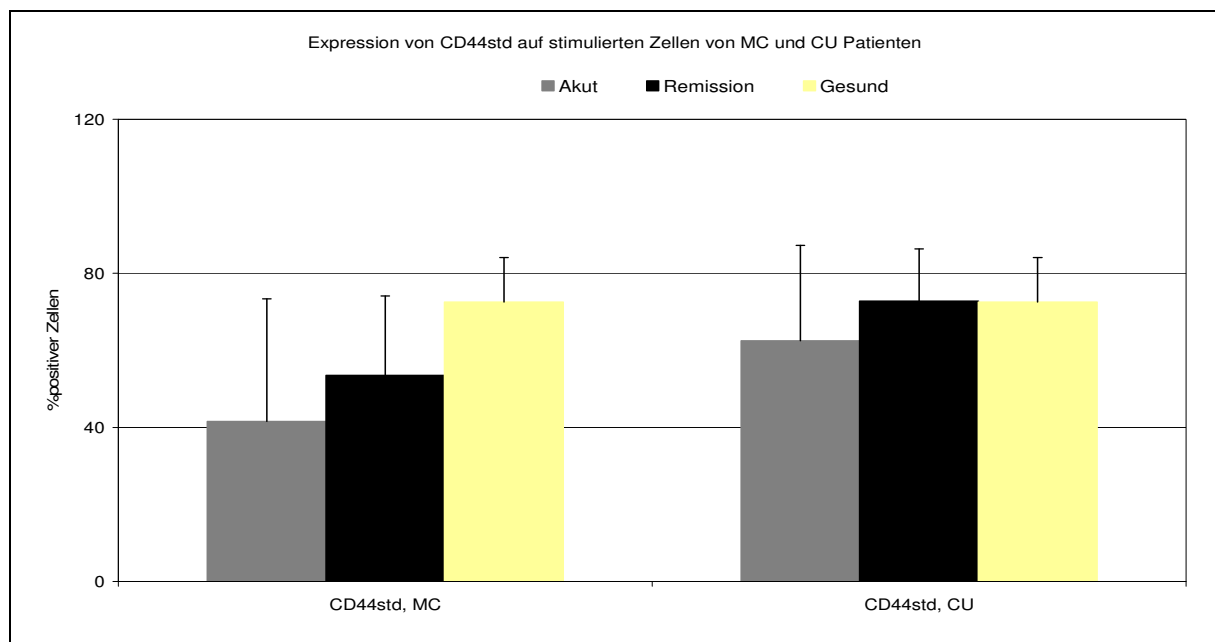


Abbildung 7: Oberflächenexpression von CD44-Standard auf Zellen von MC und CU Patienten nach *in vitro* mitogener Stimulation. Vergleich der Gruppen der Erkrankten (unterteilt in akuten und Remissionszustand) und der Gesunden.

Verglichen mit der Expression von CD44s wurde bei den Varianten Isoformen CD44v4, CD44v6 und CD44v7 über alle Gruppen hinweg eine deutlich geringere Expression detektiert (Abbildung 8). Während bei CD44s eine Frequenz von durchschnittlich 70% erreicht wurde, lag die mittlere Frequenz bei CD44v4, CD44v6 und CD44v7 sowohl im naiven Zustand als auch nach mitogener Stimulation *in vitro* unter 4%.

Ähnlich wie bei CD44-Standard wurden bei den CD44 Varianten Isoformen ausgeprägte Unterschiede zwischen der Oberflächenexpression auf naiven Zellen von Patienten mit Morbus Crohn im akuten und im Remissionszustand gefunden (Abbildung 8). Bei Patienten im akuten Zustand konnte eine signifikante Herabregulation der Frequenz positiver Zellen von CD44v4, CD44v6 und CD44v7 im Vergleich zu den Patienten im Remissionszustand und zu den gesunden Probanden gezeigt werden. Die Patienten im Remissionszustand wiesen eine vergleichbare Frequenz positiver Zellen wie die von gesunden Probanden auf.

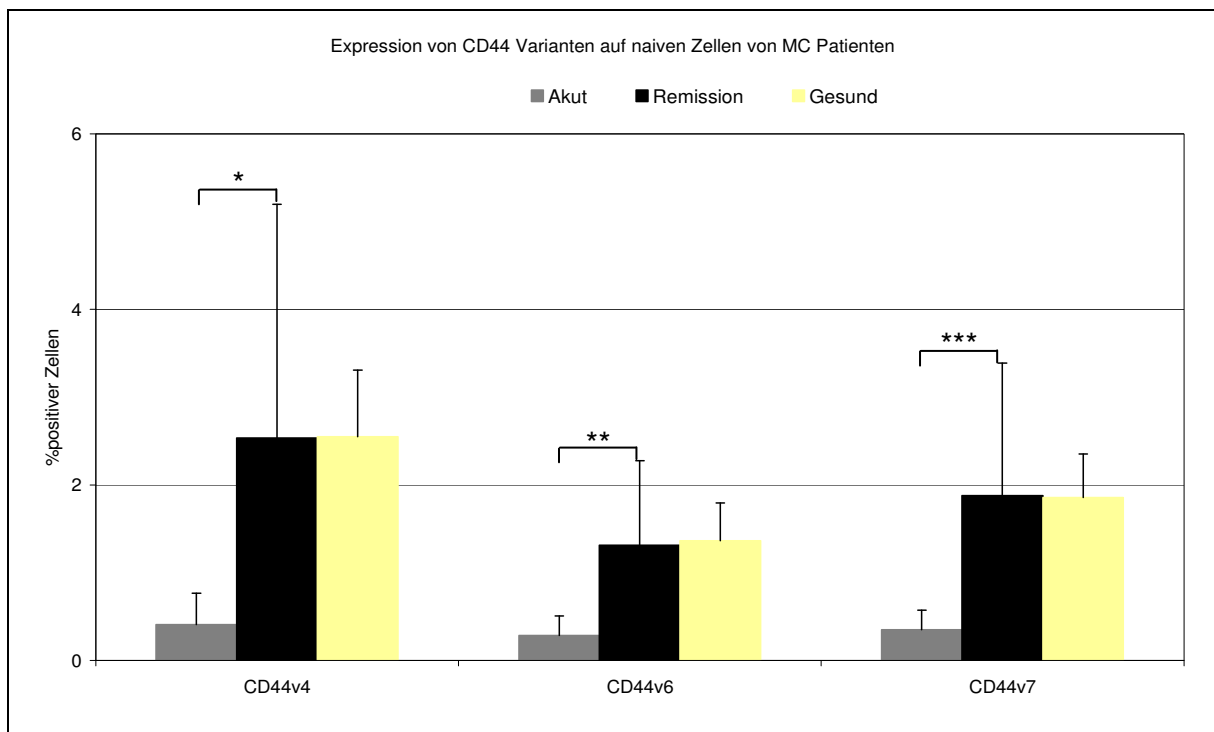


Abbildung 8: Oberflächenexpression von CD44 Varianten Isoformen auf naiven Zellen von MC Patienten. Vergleich der Gruppen der Erkrankten (unterteilt in akuten und Remissionszustand) und der Gesunden. * $p=0.0022$; ** $P=0.0367$; *** $p=0.0537$.

Im Falle der Oberflächenexpression von CD44 Varianten Isoformen auf stimulierten Zellen von Patienten mit Morbus Crohn zeigte sich lediglich eine tendenzielle Herabregulation der Frequenz positiver Zellen im akuten Zustand (Abbildung 9). Diese Herabregulation war jedoch statistisch nicht signifikant, da hohe Schwankungen im Expressionsmuster der einzelnen Gruppen auftraten.

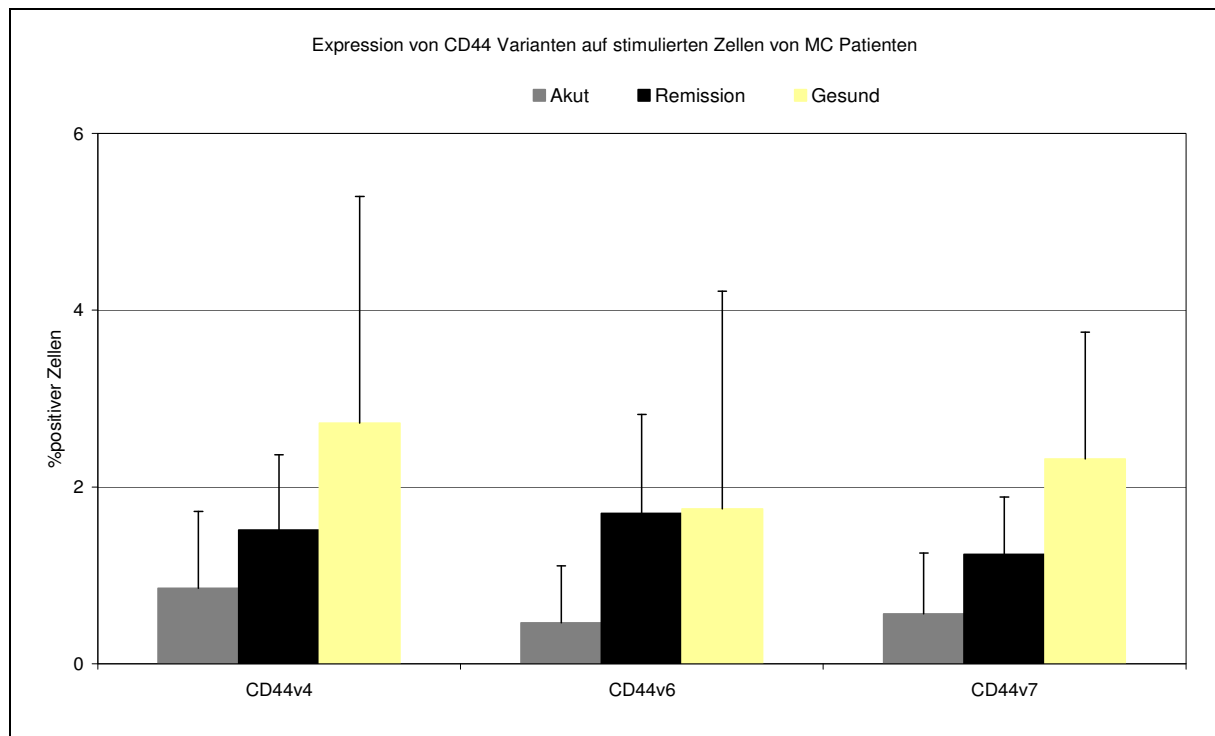


Abbildung 9: Oberflächenexpression von CD44 Varianten Isoformen auf Zellen von MC Patienten nach *in vitro* mitogener Stimulation. Vergleich der Gruppen der Erkrankten (unterteilt in akutem und Remissionszustand) und der Gesunden.

Verglichen wurde ebenfalls die Expression der Varianten Isoformen CD44v4, CD44v6 und CD44v7 sowohl auf naiven (Abbildung 10) als auch nach mitogener Stimulation der Zellen von Patienten mit Colitis ulcerosa (Abbildung 11). Dabei zeigte sich bei den naiven Zellen eine Herabregulation der Frequenz positiver Zellen bei den Patienten im akuten Zustand gegenüber den Patienten im Remissionszustand (Abbildung 10). Aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen der Oberflächenexpression bei den Patienten im Remissionszustand war diese Herabregulation jedoch bei keiner der Varianten statistisch signifikant.

Nach mitogener Stimulation der Zellen *in vitro* wurden bei allen CD44 Varianten Isoformen keine nennenswerten Unterschiede in der Expression bei Patienten im akuten und im Remissionszustand festgestellt (Abbildung 11). Die Oberflächenexpression in beiden Gruppen lag auf einem vergleichbaren Niveau und war tendenziell geringer als bei den gesunden Probanden.

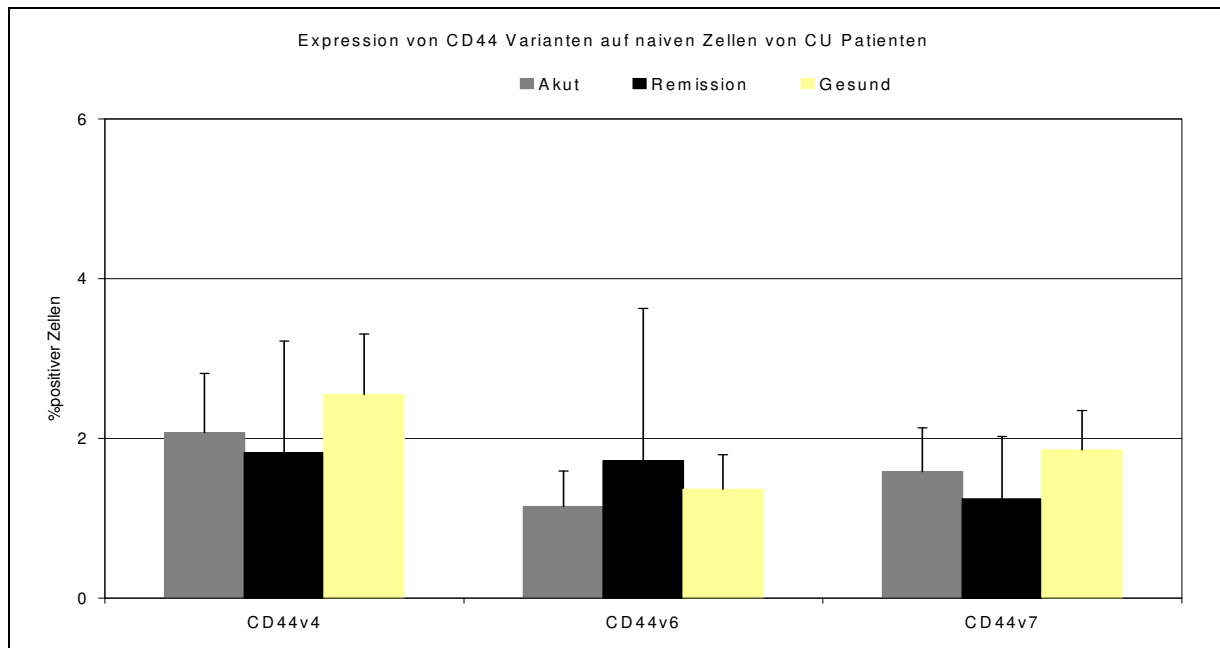


Abbildung 10: Oberflächenexpression von CD44 Varianten Isoformen auf naiven Zellen von CU Patienten. Vergleich zwischen Erkrankten und Gesunden.

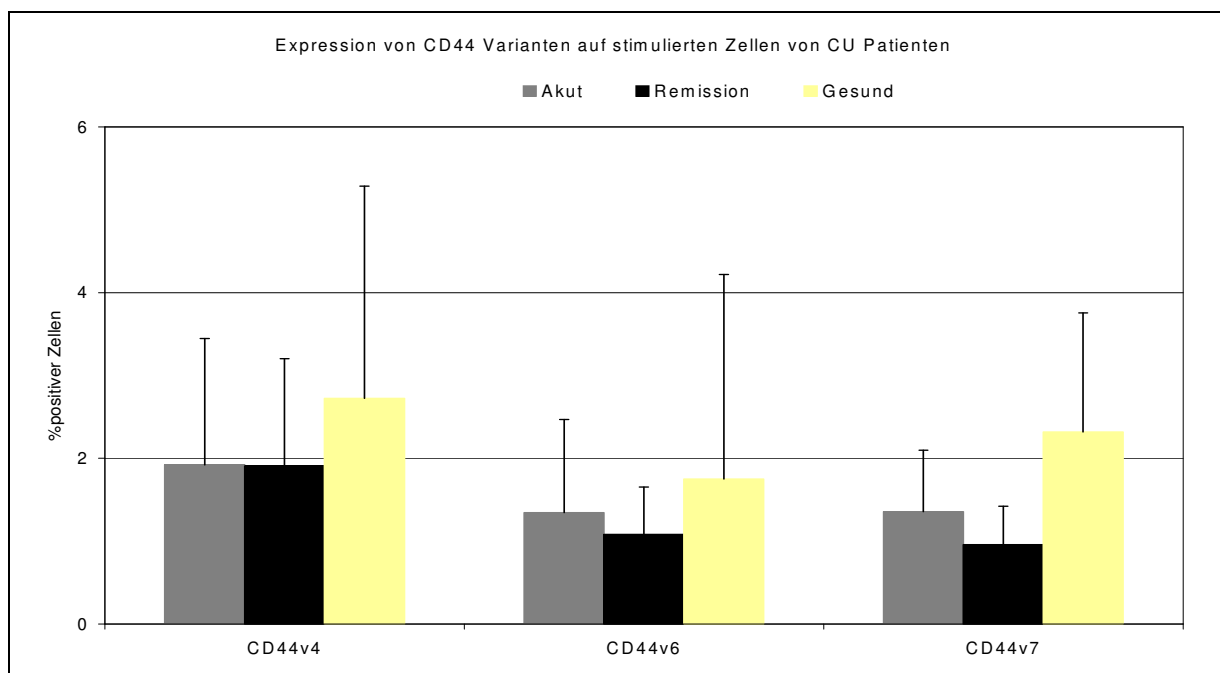


Abbildung 11: Oberflächenexpression von CD44 Varianten Isoformen auf Zellen von CU Patienten nach mitogener Stimulation. Vergleich zwischen Erkrankten und Gesunden.

3.2 Osteopontin

3.2.1 Expression von Osteopontin

Oberflächenexpression auf peripheren Blutmonozyten

Die Expression von Osteopontin vor (Abbildung 12) und nach der mitogenen Stimulation (Abbildung 13) wurde für die drei untersuchten Gruppen ausgewertet. Mit einer durchschnittlichen Expression von 2-4% lagen die Werte von Osteopontin in einem vergleichbaren Bereich, wie im Falle der Varianten Isoformen CD44v4, CD44v6 und CD44v7.

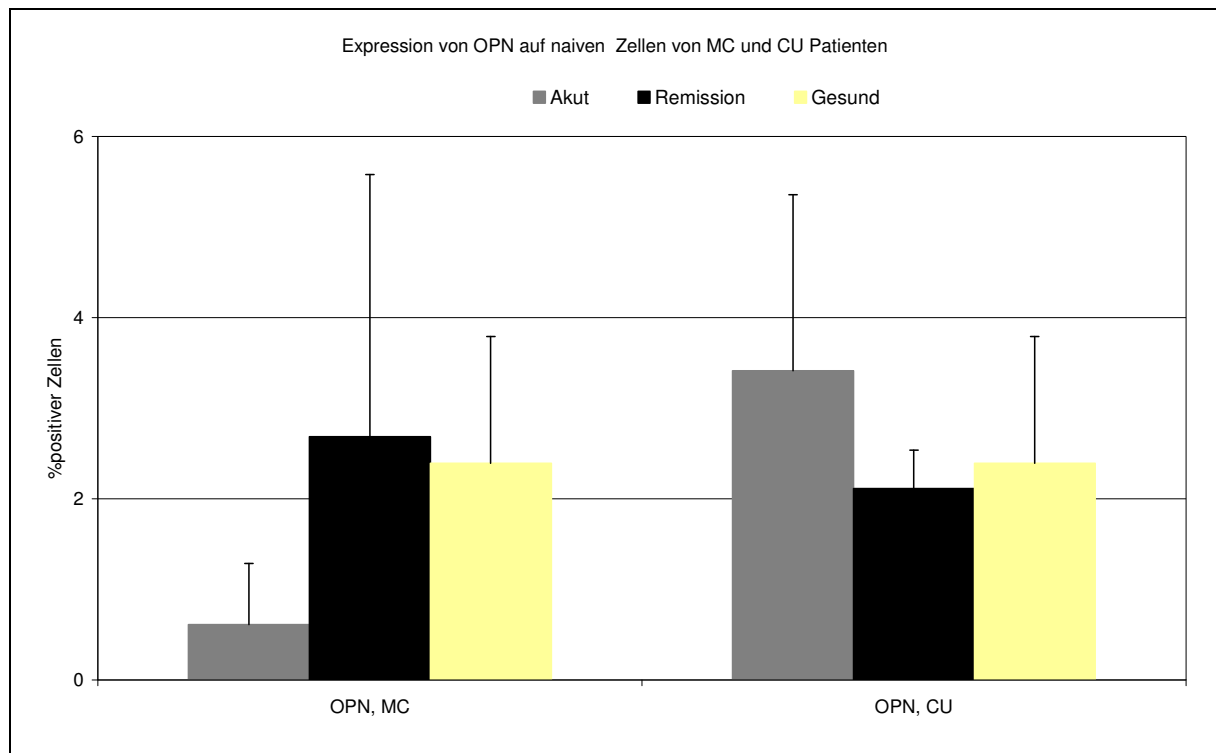


Abbildung 12: Oberflächenexpression von Osteopontin auf naiven Zellen von MC und CU Patienten. Verglichen wurden die ermittelten Werte der Erkrankten (unterteilt in akuten und Remissionszustand) mit denen der gesunden Probanden.

Während im naiven Zustand eine geringere Frequenz positiver Zellen bei den Patienten mit akutem Morbus Crohn beobachtet wurde, fand sich bei den Patienten mit akuter Colitis ulcerosa eine tendenziell erhöhte Frequenz positiver Zellen. In

beiden Fällen waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant. Nach mitogener Stimulation der Zellen *in vitro* zeigten sich keine auswertbaren Unterschiede mehr in der Expression von Osteopontin.

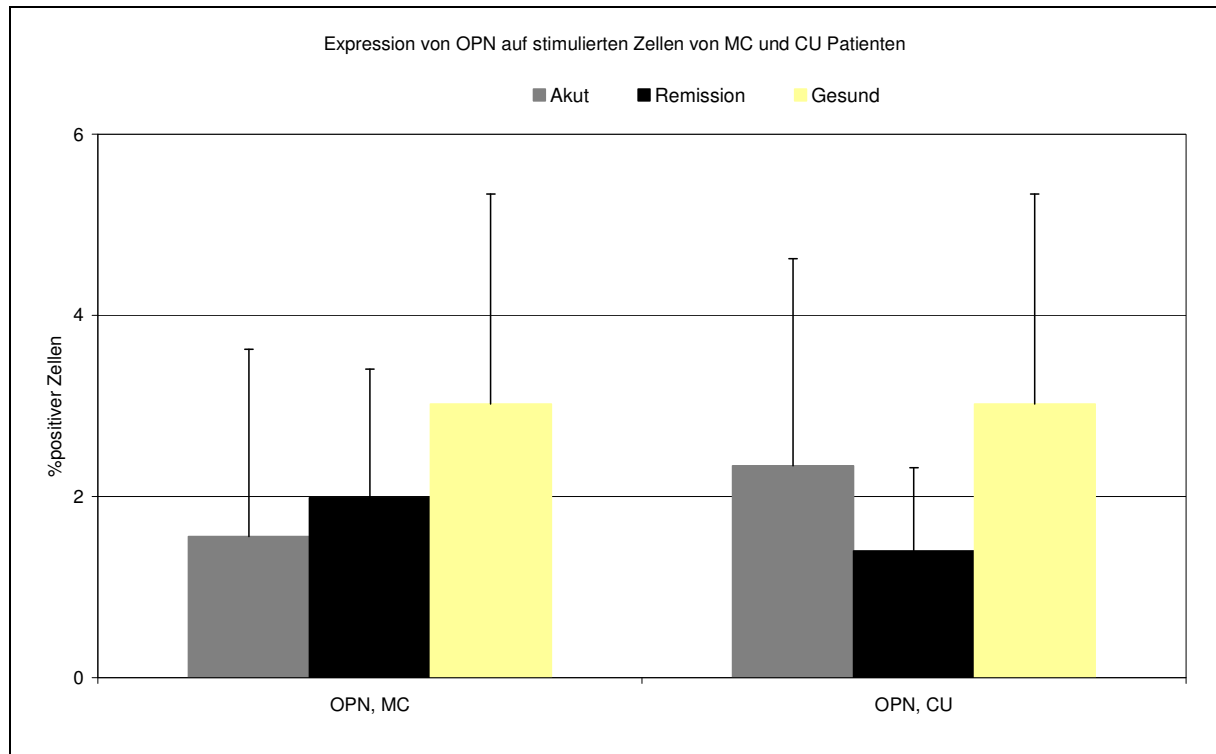


Abbildung 13: Oberflächenexpression von Osteopontin auf Zellen von MC und CU Patienten nach *in vitro* mitogener Stimulation mit PHA. Verglichen wurden die ermittelten Werte der Erkrankten (unterteilt in akuten und Remissionszustand) mit denen der gesunden Probanden.

Proteinexpression durch PBMZ und LPMZ

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse wurde die Expression von Osteopontin durch PBMZ ermittelt. Verglichen wurde die Expression bei gesunden Probanden, bei Patienten mit Morbus Crohn und bei Patienten mit Colitis ulcerosa. Zusätzlich wurde die Krankheitsaktivität der Patienten berücksichtigt.

In einem Bereich zwischen 66 kD und 77 kD wurde die höchste Proteinexpression bei Patienten mit ausgeprägter Krankheitsaktivität registriert (Abbildung 14 A, oben). Dabei wiesen aktive Morbus Crohn Patienten eine höhere Proteinexpression im Vergleich zu aktiven Colitis ulcerosa Patienten auf. Die

Proteinexpression bei den inaktiven Patienten beider Gruppen, sowie in der Kontrollgruppe unterschieden sich kaum voneinander.

Weiterhin wurde die Expression von Osteopontin durch LPMZ bei Morbus Crohn Patienten bestimmt, um den Einfluss der Krankheitsaktivität genauer zu analysieren. Es zeigte sich auch hier eine deutliche Erhöhung der Intensität mit steigendem Crohn Disease Activity Index (Abbildung 14 B, unten).

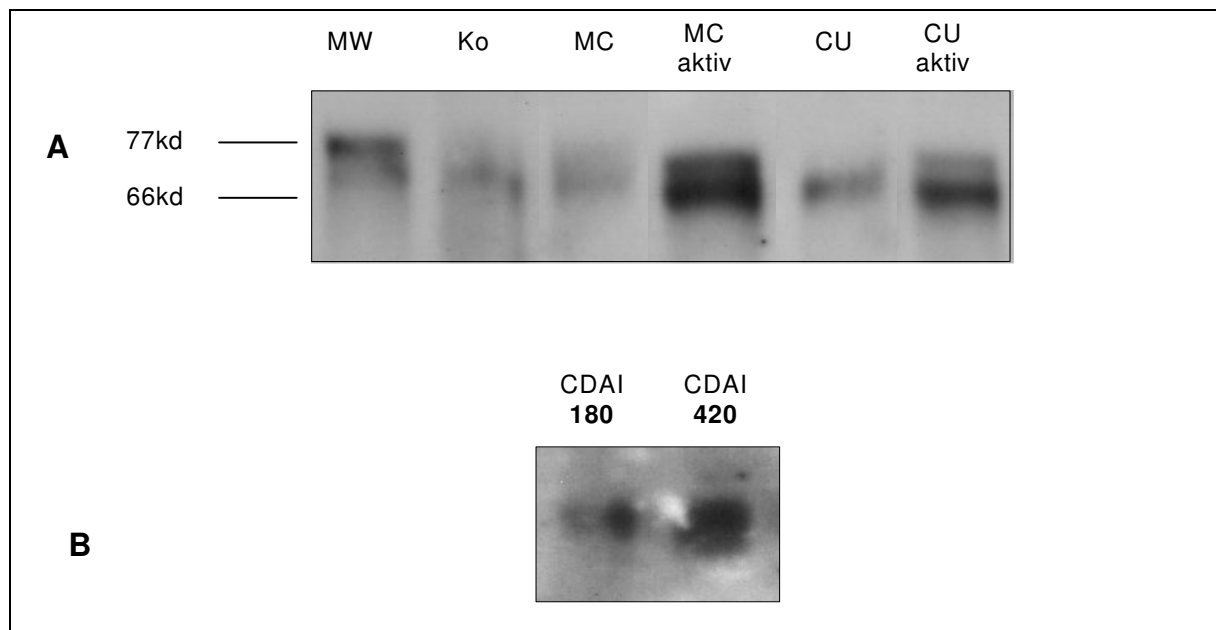


Abbildung 14: A: Expression (kD, Kilo Dalton) von Osteopontin durch PBMZ bei aktiven und inaktiven Patienten und bei gesunden Probanden. B: Expression durch LPMZ bei Morbus Crohn Patienten in Abhängigkeit vom Crohn Disease Activity Index. MW: Molecular Weight (Molekulargewicht).

3.2.2 Abhängigkeit von der Art der Erkrankung

Zusätzlich zur Osteopontinexpression in peripheren Blutlymphozyten wurde die Konzentration von Osteopontin im Blutserum von Patienten mit Morbus Crohn beziehungsweise Colitis ulcerosa und in der Kontrollgruppe aus gesunden Probanden quantifiziert. In der Auswertung wurde ebenfalls die Konzentration von Osteopontin im Blutserum von an Divertikulitis erkrankten Patienten herangezogen (Abbildung 15). Um die Aussagekraft der Vergleiche zu erhöhen und spezifischer zu

machen, wurden basierend auf den klinischen Indikatoren der Krankheitsaktivität CDAI und CAI zunächst nur Patienten mit einem mittelaktiven Krankheitsniveau berücksichtigt.

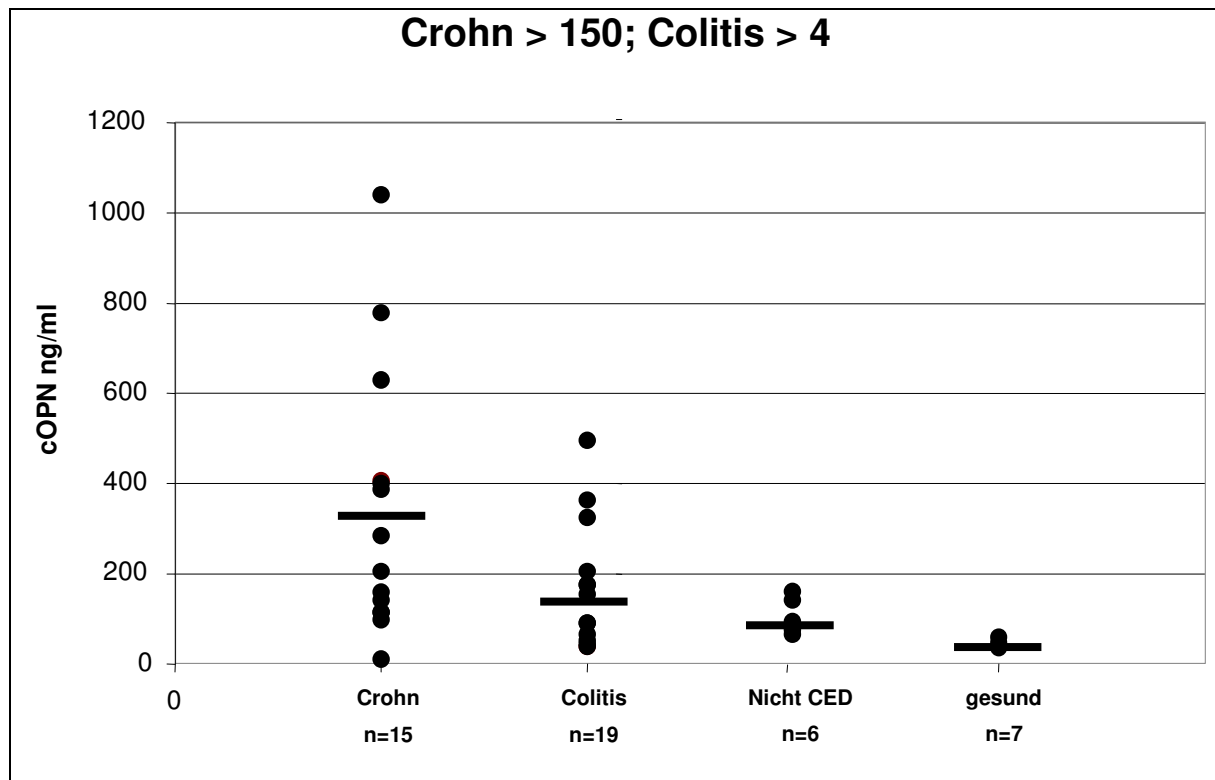


Abbildung 15: Osteopontinkonzentration im Serum von aktiven Patienten mit Morbus Crohn (CDAI>150), Colitis ulcerosa (CAI>4), im Vergleich mit Diverticulitis Patienten und gesunden Probanden.

Diese Gegenüberstellung zeigt eine deutliche Abhängigkeit der Osteopontinkonzentration im Blutserum von der Art der Erkrankung der untersuchten Personen. Im Serum von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa konnte trotz relativ grosser Variation eine erhöhte Osteopontinkonzentration detektiert werden. Mit durchschnittlichen Werten um 350 ng/ml war die Osteopontinkonzentration im Serum von Morbus Crohn Patienten höher als bei Colitis ulcerosa und bei Divertikulitis Patienten (um 175 ng/ml bzw. 100 ng/ml). Mit Durchschnittswerten unterhalb von 50 ng/ml war die Osteopontinkonzentration im Serum von Gesunden am geringsten.

Insgesamt wurden bei allen untersuchten Patienten, d.h. auch Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität und Patienten mit Colitis anderer Genese vergleichbare Osteopontinkonzentrationen im Serum beobachtet (Abbildung 16). Es konnten höhere Osteopontinkonzentrationen bei Morbus Crohn Patienten im Vergleich zu Colitis ulcerosa Patienten detektiert werden. Patienten mit aktiven Stadien zeigten höhere Expression als Patienten in inaktiven Stadien.

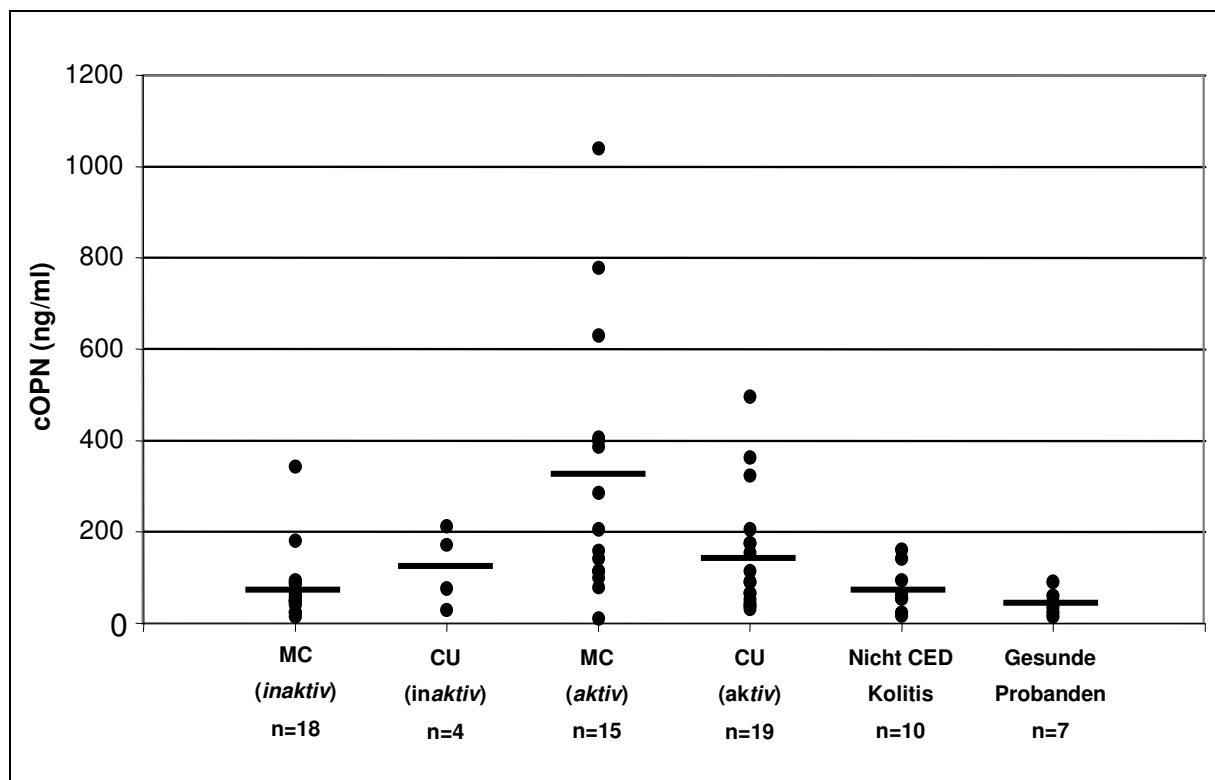


Abbildung 16: Darstellung der Osteopontinkonzentration bei allen untersuchten Patienten, sortiert nach Krankheit und Krankheitsaktivität.

3.2.3 Einfluss der Krankheitsaktivität

Um die Abhängigkeit zwischen der Osteopontinkonzentration im Serum und der Krankheitsaktivität genauer zu analysieren, wurden sowohl für die Patienten mit Morbus Crohn, als auch für diejenigen mit Colitis ulcerosa die ermittelten Konzentrationswerte über dem korrespondierenden Aktivitätsindex aufgetragen. Aus den erhaltenen Diagrammen wurde jeweils eine lineare Trendlinie abgebildet (Abbildung 17).

Im Falle von Morbus Crohn Patienten zeigte sich eine signifikante, positive Korrelation zwischen der Osteopontinkonzentration im Serum und dem Crohn Disease Activity Index (CDAI): mit steigenden CDAI-Werten stieg auch die im Serum ermittelte Konzentration von Osteopontin an. Ausgehend von Osteopontinkonzentrationen um 100 ng/ml bei Patienten mit geringerer Krankheitsaktivität wurden Werte von bis zu 1000 ng/ml bei stark aktiven Patienten ermittelt. Die Verteilung der Punktwolke zeigt jedoch, dass die meisten Patienten in einem CDAI-Bereich von 50 bis 200 liegen.

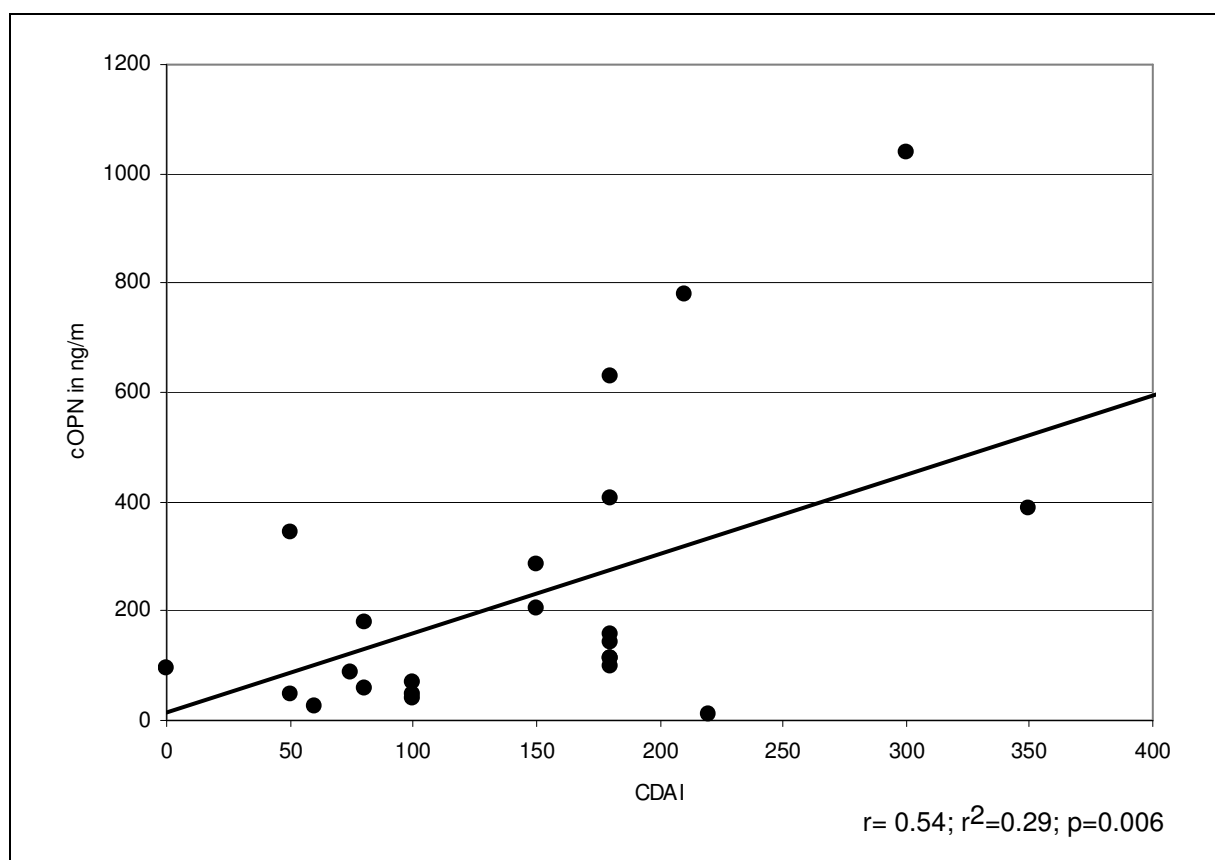


Abbildung 17: Korrelation zwischen der Osteopontinkonzentration im Serum und der Krankheitsaktivität. Eine Erhöhung des Crohn Disease Activity Indexes (CDAI) führt zu einer Erhöhung der Osteopontinkonzentration im Serum. r : Pearson correlation coefficient, p : Signifikanzniveau.

Im Gegensatz zur Gruppe der Morbus Crohn Patienten konnte in der Gruppe der Colitis ulcerosa Patienten keine signifikante Korrelation zwischen der Osteopontinkonzentration im Serum und dem Colitis Activity Index (CAI) festgestellt werden (Abbildung 18). Erhöhte CAI-Werte scheinen keine Veränderung der

Konzentration von Osteopontin im Serum der untersuchten Patienten hervorzurufen. Durchschnittlich lagen die Konzenrationswerte hier um 175 ng/ml, gleichmässig verteilt in einem CAI-Bereich zwischen 2 und 12.

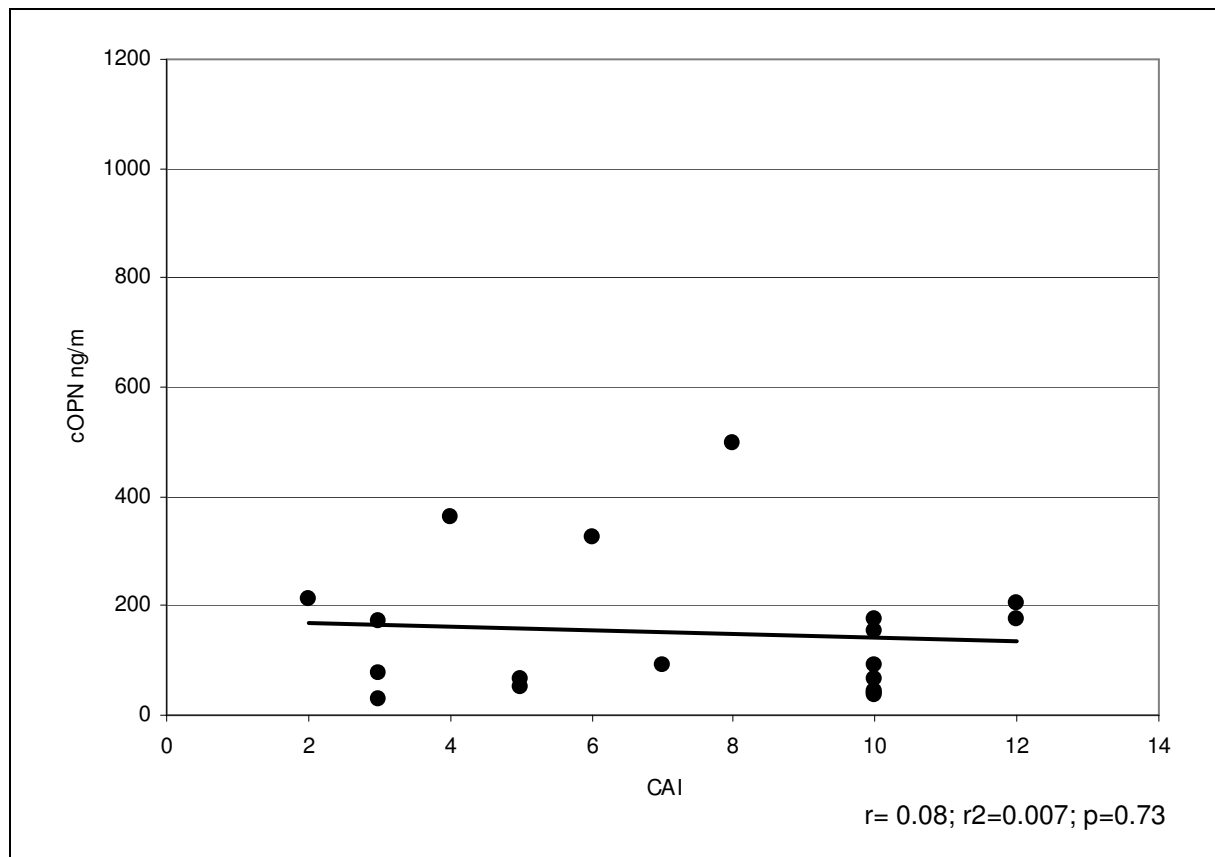


Abbildung 18: Abhängigkeit der Osteopontinkonzentration im Serum von der Krankheitsaktivität. Eine Erhöhung des Colitis Disease Indexes (CAI) führt zu keiner signifikanten Änderung der Osteopontinkonzentration im Serum. r : Pearson correlation coefficient, p : Signifikanzniveau.

3.2.4 Sekretion von Osteopontin durch verschiedene Zelltypen

Die Konzentration von Osteopontin im Kulturüberstand von verschiedenen Zellen (Abbildung 19) wurde mittels ELISA ermittelt, um den Zusammenhang zwischen der Sekretion und dem Zelltyp zu analysieren. Die Analysen wurden an peripheren Blutlymphozyten, an Lamina Propriazellen, an Monozyten und an dendritischen Zellen, die sowohl Morbus Crohn Patienten, als auch gesunden Probanden entnommen wurden, durchgeführt. Die Auswertung wurde auf Morbus

Crohn Patienten beschränkt, aufgrund der bei Ihnen ermittelten höheren Osteopontinkonzentrationen im Vergleich zu Colitis ulcerosa Patienten.

Von den untersuchten Zellen wiesen dendritische Zellen, mit Werten über 400 ng/ml, die mit Abstand höchste Osteopontinkonzentration auf. In der Kontrollgruppe erreichte die Osteopontinsekretion in dendritischen Zellen fast 600 ng/ml (Abbildung 19). In den Kulturüberständen von Monozyten konnte in beiden Gruppen eine Osteopontinkonzentration um 125 ng/ml ermittelt werden. Bei peripheren Blutlymphozyten und Lamina Propriazellen konnten keine höheren Konzentrationen detektiert werden. Auch hier traten lediglich leichte Unterschiede zwischen der Sekretion bei Morbus Crohn Patienten und bei gesunden Probanden auf.

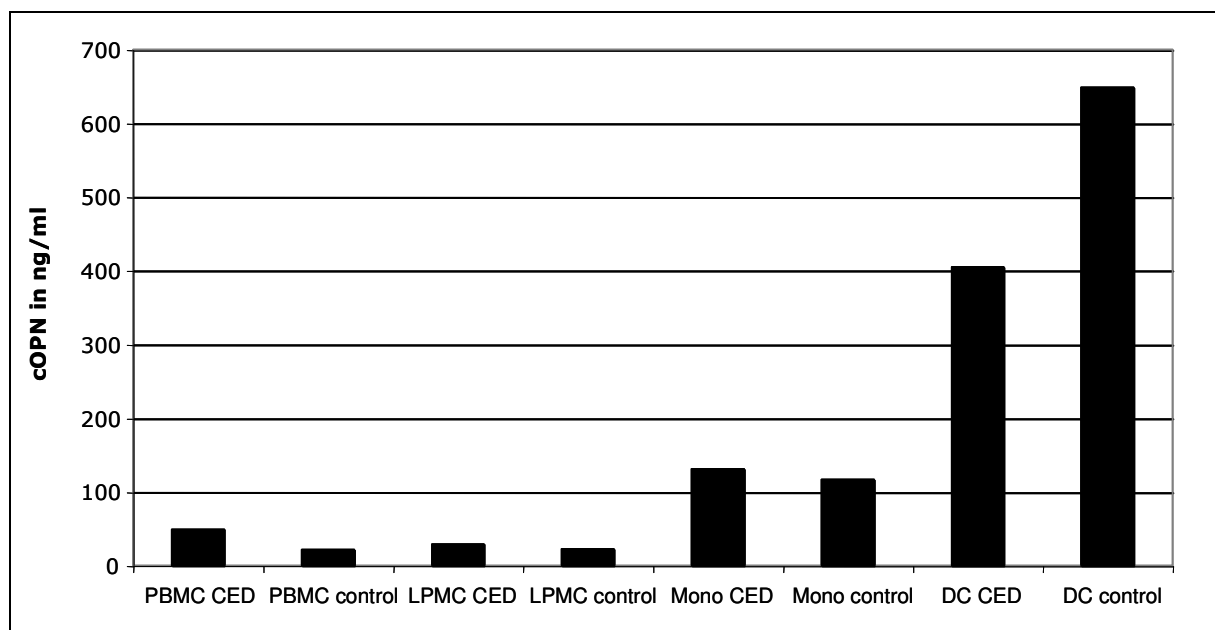


Abbildung 19: Darstellung der Osteopontinkonzentration in verschiedenen Zelltypen bei Morbus Crohn Patienten und bei gesunden Probanden. Mono: Monozyten, DC: Dendritische Zellen.

3.3 Kostimulatorische Funktion von Osteopontin

In einem Vorversuch wurde die aktivierende und proliferierende Wirkung von Osteopontin auf T-Zellen untersucht. Dabei wurde die Sekretion von IFN γ in mit Osteopontin inkubierten T-Zellen mittels ELISA ermittelt. Es wurde keine IFN γ -Produktion durch diese Zellen festgestellt. In einem weiteren, indirekten Versuch

wurden dendritische Zellen und T-Zellen mittels CFSE Labeling durchflusszytometrisch untersucht. Beide Zelltypen wurden mit und ohne Osteopontin stimuliert. Es zeigte sich in beiden Populationen kein Unterschied in der Proliferation von Zellen (Abbildung 20, A).

Weiterhin wurde die Apoptoserate der verschiedenen Zellpopulationen nach Nicoletti et al. untersucht. Die mit Osteopontin stimulierten dendritischen Zellen und T-Zellen wiesen eine vergleichbare Apoptoserate auf, wie die Zellen ohne Osteopontinstimulation (Abbildung 20, B). Die Ergebnisse dieses Versuchs lassen daher nicht auf eine kostimulatorische Wirkung von Osteopontin schliessen.

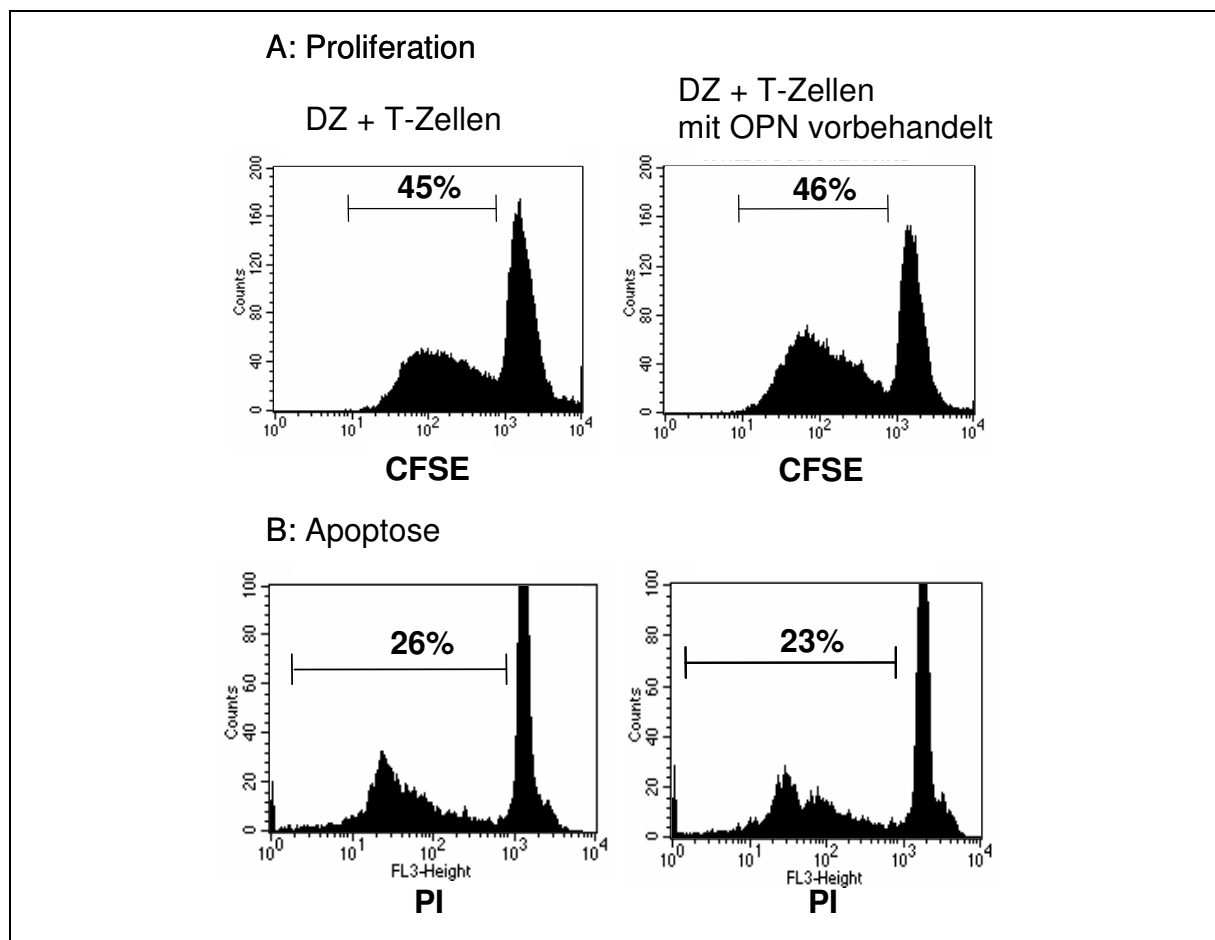


Abbildung 20: Repräsentative Muster der Analyse der Zellproliferation mittels CFSE *in vitro* (A) und der Apoptose nach Nicoletti (B). T-Zellen und dendritische Zellen wurden vor der Inkubation mit Osteopontin CFSE-markiert. PI: Propidiumjodid.

4 Diskussion

Die Entdeckung des Moleküls CD44 und seines Liganden Osteopontin in den vergangenen Jahren eröffnete ein neues Forschungsgebiet in der Medizin. Bisherige Studien zur Analyse von CD44 und Osteopontin weisen sowohl am Tiermodell, als auch beim Menschen, auf ihre bedeutende Rolle in Entzündungsprozessen hin (Weber et al. 1996; Ashkar et al. 2000; Weber et al. 2002). Vermehrt wird der Frage nachgegangen, ob CD44 Variante Isoformen und der Ligand Osteopontin an der Immunantwort bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt sind und ob ihre Expression mit dem Krankheitsbild korreliert. Hintergrund dieser Studien ist eine mögliche Einführung eines CD44 Varianten Isoformen Antikörpers in die Klinik, der spezifisch in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eingesetzt werden könnte.

Das Ziel dieser Studie war, die Expression von aktivierungsabhängigen CD44 Varianten Isoformen und des Liganden Osteopontin zu untersuchen und die Abhängigkeit zwischen der ermittelten Expression und dem Verlauf der Erkrankung, zu analysieren. Die experimentellen Untersuchungen wurden an frisch isolierten und *in vitro* stimulierten mononukleären Zellen des peripheren Bluts und der Lamina Propria von Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und gesunden Probanden durchgeführt.

4.1 Expression der CD44-Varianten auf peripheren Blutlymphozyten

Dem Molekül CD44 wird eine wichtige Funktion in biologischen Prozessen zugesprochen. Diese Funktion wird mit der Vielfältigkeit der durch alternatives Splicing entstandenen isoformen Varianten von CD44 in Zusammenhang gebracht. Durch die Heterogenität können verschiedene Moleküle gebunden werden und damit

auf intra- und extrazelluläre Stimuli reagieren (Gunthert *et al.* 1998). So beschreiben Ponta und Mitarbeiter in einer Übersichtsarbeit unterschiedliche Varianten und ihre Funktionen (Ponta *et al.* 2003): Darin wird CD44s als kleinste, ubiquitär vorkommende Isoform beschrieben und eine Rolle bei der Lymphozytenreifung und Migration zugesprochen. Weiterhin werden den CD44 Varianten Isoformen folgende Funktionen zugesprochen: die Variante CD44v3 fungiert als Rezeptor für Wachstumsfaktoren. Die Varianten CD44v4 und CD44v5 stellen Moleküle für die Akkumulation von Neutrophilen und Rezeptorsignalisierung dar. Die Varianten CD44v6 und CD44v7 sind für die Zytokinsignalisierung und die Migration von dendritischen Zellen wichtig. Ausserdem spielen die Varianten CD44v4/v6/v7 eine Rolle in der Tumormetastasierung (Weg-Remers *et al.* 1998).

Der Einfluss von CD44 Varianten Isoformen in Bezug auf Darmerkrankungen wurde in der Vergangenheit von verschiedenen Autoren untersucht. Im Rahmen einer tierexperimentellen Studie an Mäusen wurde die Rolle von CD44v4 und CD44v7 in der Aufrechterhaltung von Entzündungen in induzierter Dextrane Sodium Sulfate (DSS) Kolitis von Farkas und Mitarbeitern (Farkas *et al.* 2005) analysiert. Nach Behandlung mit monoklonalen anti-CD44v4-Antikörpern wurde eine Heraufregulation von CD44v4 im Darm, jedoch kein entzündungshemmender Effekt beobachtet. In einer Studie an Patienten mit metastasierendem kolorektalen Karzinom, beziehungsweise Adenokarzinom, gingen Weg-Remers und Mitarbeiter (Weg-Remers *et al.* 1998) der Frage nach, ob CD44v6 als unabhängiger Tumormarker angesehen werden kann. Sie fanden eine Abhängigkeit zwischen der Expression von CD44v6 und dem Tumorstadium. Auf ähnliche Ergebnisse kamen Mulder und Mitarbeiter (Mulder *et al.* 1994) in ihrer Studie auch an Patienten mit kolorektalem Karzinom.

Weiterhin wurde von Wittig und Mitarbeitern (Wittig *et al.* 2002) die Beteiligung der Varianten Isoformen CD44v6 und CD44v7 in der mukosalen Immunantwort untersucht. Die Autoren zeigten am Tiermodell, dass diese Varianten Isoformen insbesondere in Entzündungsherden auf dem Darmepithel stark hochreguliert wurden. Diese Überexpression fand auf aktivierten, jedoch nicht auf nicht-aktivierten

Lymphozyten und Monozyten statt. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit denen von Arch und Mitarbeitern (Arch *et al.* 1992), die eine Überexpression der Varianten Isoform CD44v6 nach antigenspezifischer Stimulation im Mausmodell beschreiben.

Angesichts dieser Erkenntnisse wurde die Hypothese formuliert, dass CD44s und die Varianten Isoformen CD44v6, CD44v7 (eventuell auch CD44v4) auf Blutlymphozyten von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen überexprimiert werden und daher als spezifische Marker für diese Erkrankungen verwendet werden können. Dafür wurden im Rahmen dieser Studie periphere Blutlymphozyten von CED Patienten analysiert.

In den drei untersuchten Gruppen (MC Patienten, CU Patienten und gesunde Probanden) wurde eine hohe Expression von CD44s registriert. Die Varianten Isoformen CD44v4, CD44v6 und CD44v7 hingegen wurden nur gering exprimiert. Diese Ergebnisse stimmen mit Erkenntnissen aus früheren Studien überein, in denen CD44s als ubiquitär und somit als meist exprimierte Variante dargestellt wird (Aruffo *et al.* 1990; Ponta *et al.* 2003). Weiterhin deutet die relativ niedrige Expression der Varianten Isoformen auf peripheren Blutlymphozyten darauf hin, dass die Varianten Isoformen eher lokal im Darm exprimiert werden und nicht ubiquitär vorkommen (Weg-Remers *et al.* 1998).

Bei den Patienten machte sich die Krankheitsaktivität auf die Oberflächenexpression von CD44s im naiven Zustand bemerkbar. Bei Morbus Crohn Patienten im akuten Zustand wurde eine signifikant geringere Expression im Vergleich zu den Patienten im Remissionszustand und den gesunden Probanden registriert. Ebenso wurde die Expression der Varianten Isoformen CD44v4, CD44v6 und CD44v7 bei akuten Morbus Crohn Patienten signifikant reduziert. Bei den Colitis ulcerosa Patienten im akuten Zustand wurden im Vergleich zu den Patienten im Remissionszustand und den gesunden Probanden tendenziell gleichbleibende Frequenzen positiver Zellen von CD44s und seinen Varianten Isoformen registriert.

Diese Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu anderen Publikationen, wo die Varianten Isoformen CD44v6 und CD44v7 auf peripheren Blutlymphozyten von CED Patienten stark überexprimiert wurden (Rosenberg *et al.* 1995; Camacho *et al.* 1999; Wittig *et al.* 1999). Allerdings gibt es auch eine Studie mit CED Patienten, in der beschrieben wurde, dass die Variante Isoform CD44v6 auf Lamina Propria Zellen während der Entzündung herunterreguliert wird (Pfister *et al.* 2001). Unklar bleibt jedoch, über welche Wege die Expression reguliert wird. Pfister und Mitarbeiter führen diese möglicherweise auf ein ungeeignetes kostimulatorisches Signal in der Aktivierung von T-Zellen zurück.

Diese Unterschiede können durch die eingeleitete Therapie der Morbus Crohn und der Colitis Ulcerosa Patienten im akuten Krankheitszustand erklärt werden. Bei einer akuten Entzündung wird die Expression von CD44 und seinen Varianten Isoformen auf aktivierten T-Zellen durch Zytokine (TNF α oder IL1) verstärkt induziert. Zum Zeitpunkt der Analyse hatten die Patienten im akuten Stadium bereits eine systemische Gabe von Cortison erhalten. Die systemische Gabe von Cortison bewirkt unter anderem eine Hemmung der Lymphozytenproliferation und kann somit zu der beobachteten Reduktion der Oberflächenexpression von CD44s und seinen Varianten Isoformen geführt haben. Weiterhin wurden einige Patienten aus dieser Studie mit Azathioprin behandelt. Auch wenn der genaue Wirkmechanismus dieses Medikamentes bis dato nicht vollständig geklärt ist, wird ihm jedoch ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die Lymphozytenproliferation zugesprochen (Pope *et al.* 2006).

Nach mitogener Stimulation der Zellen *in vitro* konnten sowohl bei Morbus Crohn als auch Colitis ulcerosa Patienten keine Unterschiede in der Expression der Varianten Isoformen mehr festgestellt werden. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von der von Wittig und Mitarbeitern (Wittig *et al.* 1999) beschriebenen Hochregulation der Varianten nach Stimulation. Diese Unterschiede können auf die in beiden Studien herangezogenen Patienten zurückgeführt werden. In der Tat waren die Patienten aus der vorliegenden Studie meist in einem wenig akuten Stadium bzw. in Remission, im Gegensatz zu den Patienten aus der Studie von Wittig und

Mitarbeitern, die sich zum grössten Teil in einem aktiven Stadium befanden. Ausserdem wurden sämtliche Patienten dieser Studie zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits mit einer systemischen Gabe von Medikamenten vorbehandelt, während Patienten aus der Vergleichstudie teilweise lokal mit Cortison therapiert wurden. Aufgrund des gerade beschriebenen Effektes von Cortison könnte dies daher einen negativen Einfluss auf die stimulierte mitogene Proliferation im Patientenblut gehabt haben.

Da die in dieser Studie beobachtete Runterregulation der Expression in der Gruppe der Morbus Crohn Patienten am meisten ausgeprägt war, wurde zusätzlich die Expression von CD44s unter Verwendung dreier verschiedener Antikörperklone bestimmt, um eine unspezifische Bindung auszuschliessen. Dabei wurde von der Hypothese ausgegangen, dass CD44s bei starker Entzündung von der Zelloberfläche abgelöst wird und ins Blut gelangt; ein Phänomen das als „Shedding“ bezeichnet wird (DeGrendele *et al.* 1997; Cichy und Pure 2003). Diese Hypothese stützt sich auch auf eine Beobachtung von Krettek und Mitarbeitern (Krettek *et al.* 2004), dass pro-inflammatorische Zytokine sowohl die CD44-Oberflächenexpression als auch seine Abspaltung von der Zelloberfläche verstärken. Alle drei Antikörperklone zeigten vor und nach mitogener Stimulation vergleichbare Expressionsmuster, was eine unspezifische Bindung der Antikörperklone ausschließt.

In dieser Studie wurden relativ hohe Standardabweichungen in der Oberflächenexpression der verschiedenen Gruppen registriert. Dies lässt teilweise nur eine trendmässige Deutung der Ergebnisse zu. Diese Abweichungen können auf das relativ inhomogene Patientenkollektiv hinsichtlich Alter, Therapie und eventuell Vorgeschichte zurückgeführt werden.

4.2 Expression von Osteopontin auf peripheren Blutlymphozyten

Osteopontin gilt als sehr wichtiges Molekül, das sowohl auf T-Zellen, als auch auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird. Diesem Molekül wird eine bedeutende Rolle in der TH1 vermittelten Immunantwort beigemessen (Ashkar *et al.* 2000; Denhardt *et al.* 2001b; Renkl *et al.* 2005). Ashkar und Mitarbeiter konnten an Osteopontin defizienten Mäusen eine Beeinträchtigung der Typ-1 Immunität gegen virale Infektionen durch Herpes Simplex Virus-1 zeigen. Renkl und Mitarbeiter fanden ebenfalls heraus, dass Osteopontin durch die Aktivierung von Zytokinen die TH1-Immunantwort beeinflusst.

Ausgehend von den Erkenntnissen aus diesen Studien stellte sich die Frage nach der Rolle von Osteopontin in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Um dies zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Oberflächenexpression von Osteopontin auf peripheren Blutlymphozyten von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten durchflusszytometrisch ermittelt und gegenübergestellt. Morbus Crohn ist bekanntlich eine Erkrankung mit überwiegend TH1-vermittelter Immunantwort, während Colitis ulcerosa eher durch eine TH2-vermittelte Immunantwort gekennzeichnet wird (Fuss *et al.* 1996; Parronchi *et al.* 1997). Deshalb wurde angenommen, dass Morbus Crohn und Colitis ulcerosa unterschiedliche Expressionsniveaus von Osteopontin auf der Zelloberfläche aufweisen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass Osteopontin im Vergleich zu CD44s kaum auf der Oberfläche peripherer Blutlymphozyten exprimiert wird. In der Literatur wird beschrieben, dass Osteopontin ein intrazelluläres Protein ist, das bei definierten Signalen sezerniert wird und an die Oberfläche gelangt, um beispielsweise Bindungen mit CD44v6, CD44v7 oder Intergrinen einzugehen (Katagiri *et al.* 1999). Da die Expression von CD44v7 mit der Krankheitsaktivität von Morbus Crohn Patienten zusammenhängt (Abbildung 8), kann daher auch die Osteopontinsekretion als ein Maß der Krankheitsaktivität angesehen werden.

In einem weiteren Schritt wurde die Osteopontinexpression mit Hilfe der Western-Blot-Analyse ermittelt. Ziel dabei war, den zellulären Ursprung der Osteopontinexpression zu analysieren. Ein Vergleich der Expression bei gesunden Probanden, bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ohne Berücksichtigung der Aktivität zeigte kaum Unterschiede. Wurde jedoch die Krankheitsaktivität der Patienten herangezogen, so konnten nicht nur verstärkte Intensitäten im Allgemeinen beobachtet werden, sondern es zeigte sich eine deutlich verstärkte Expression bei Morbus Crohn Patienten im Vergleich zu Colitis ulcerosa Patienten.

Diese Ergebnisse stimmen mit einer Studie von Sato und Mitarbeitern überein (Sato *et al.* 2005) und wurden durch eine differenziertere Analyse der Proteinexpression auf Lamina Propria Zellen von Morbus Crohn Patienten verdeutlicht. In der vorliegenden Studie konnte ein Zusammenhang zwischen der Osteopontinexpression und der Krankheitsaktivität beobachtet werden. Eine Erhöhung des Crohn Disease Activity Indexes ging mit einer stärkeren Intensität einher. Bekanntlich wird Osteopontin tatsächlich auf Epithelzellen exprimiert, die eine wichtige Rolle in der Wechselwirkung mit der extrazellulären Umgebung spielen (Brown *et al.* 1992). Insgesamt deuten die vorliegenden Ergebnisse auf eine Beteiligung von Osteopontin an der TH1-Immunantwort hin.

4.3 Osteopontinkonzentration im Serum und Art der Erkrankung

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse konnte bereits ein Unterschied in der Osteopontinexpression bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten beobachtet werden. Um den oben erwähnten Zusammenhang zwischen der Osteopontinkonzentration und einer TH1-gesteuerten Immunantwort weiter nachzugehen, wurde die Osteopontinkonzentration im Serum von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten, sowie von Patienten mit Colitis anderer Genese und gesunden Probanden gemessen. Auch hier wurde eine höhere Konzentration von Osteopontin im Serum von Morbus Crohn Patienten im Vergleich zu Colitis ulcerosa

Patienten beobachtet. Dabei spielte auch die Krankheitsaktivität eine Rolle: so wurden höhere Konzentrationen bei aktiven Patienten beider Gruppen gemessen. Über ähnliche Ergebnisse berichten Masuda und Mitarbeiter (Masuda *et al.* 2003) in einer Studie zum Vergleich der Genexpression von Osteopontin bei Colitis ulcerosa Patienten und gesunden Probanden. Die niedrigen Konzentrationen von Osteopontin bei den Patienten mit Colitis anderer Genese und bei den gesunden Probanden unterstützen die Hypothese der vorwiegend immunmodulatorischen Rolle von Osteopontin.

Diese immunmodulatorische Rolle von Osteopontin bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte durch den Zusammenhang zwischen der Osteopontinkonzentration im Serum und dem Aktivitätsindex aufgezeigt werden. Bei Morbus Crohn Patienten konnte eine signifikant positive Korrelation zwischen gemessener Konzentration und Krankheitsaktivität ermittelt werden: Mit steigender Krankheitsaktivität wurde im Serum der Patienten ebenfalls eine erhöhte Osteopontinkonzentration registriert. Eine solche Beteiligung von Osteopontin in der TH1-Immunantwort in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde ebenfalls von Sato und Mitarbeitern (Sato *et al.* 2005) beschrieben.

Dagegen konnte keine direkte Korrelation zwischen der Osteopontinkonzentration und der Krankheitsaktivität bei Colitis ulcerosa Patienten festgestellt werden. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von Osteopontin in der TH1-Immunantwort, gekennzeichnet durch eine erhöhte Osteopontinsekretion bei Morbus Crohn. Diese Sekretion wirkt möglicherweise regulatorisch auf Zellen des Darmes und trägt somit zu einer Hemmung der Apoptose und demzufolge zum Überleben der Epithelzellen im Falle einer Entzündung bei, wie auch von Denhardt und Mitarbeitern postuliert (Denhardt *et al.* 2001a).

4.4 Osteopontin als kostimulatorisches Molekül bei CED

Die Differenzierung in TH1- und TH2-Immunantworten wird in vielen Studien mit einem kostimulatorischen Signal in Verbindung gebracht (Rulifson *et al.* 1997; Tao *et al.* 1997; Gilfillan *et al.* 1998; Kubo *et al.* 1999; Kishimoto *et al.* 2000). Kostimulatorische Moleküle verstärken das Signal der T-Zell Rezeptorerkennung und induzieren mit Hilfe Antigen Präsentierender Zellen (APZ) die primäre T-Zell-Antwort (Nagai *et al.* 2001). In seiner Funktionsweise wird Osteopontin als kostimulatorisches Molekül beschrieben.

Ashkar und Mitarbeiter (Ashkar *et al.* 2000) beschrieben Osteopontin als ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches dendritische Zellen und Makrophagen aktiviert, die Differenzierung von T-Zellen zu TH1-Zellen fördert und letztendlich eine TH1-Immunantwort hervorruft. Es galt zunächst abzuklären, welche Zellen bei den in dieser Studie eingeschlossenen Morbus Crohn Patienten Osteopontin sezernieren. Die Konzentration von Osteopontin wurde daher im Kulturüberstand von peripheren Blutlymphozyten, von Lamina Propriazellen, von Monozyten und von dendritischen Zellen aus Morbus Crohn Patienten und gesunden Probanden mittels ELISA ermittelt. Es stellte sich heraus, dass Osteopontin sowohl bei Morbus Crohn Patienten, als auch bei gesunden Probanden in erster Linie von dendritischen Zellen sezerniert wird. Zusätzlich waren Monozyten und Lamina Propria Zellen an einer Osteopontinsekretion beteiligt, wie auch von Gasser und Mitarbeitern gezeigt (Gassler *et al.* 2002).

Entgegen den Erwartungen und den Berichten aus früheren Studien (Ashkar *et al.* 2000; Koguchi *et al.* 2002; Renkl *et al.* 2005) führte die Analyse von Osteopontin inkubierten T-Zellen mittels ELISA zu keiner Produktion von IFN γ . Auch ein indirekter Versuch mit dendritischen Zellen und T-Zellen mittels CFSE Labeling zeigte, dass die T-Zellen durch Osteopontin nicht stärker proliferierten. In der Literatur finden sich auch Hinweise für eine nicht kostimulatorische Wirkung von Osteopontin, wenn auch diese Studien meist tierexperimenteller Art sind (Nau *et al.* 1999; Potter *et al.* 2002;

Abel *et al.* 2005). So führen beispielsweise Abel und Mitarbeiter die fehlende Polarisierung von T-Zellen durch Osteopontin auf eine mögliche Wirkung von Lipopolysacchariden (LPS) zurück, die zur Zellgenerierung verwendet werden. LPS aktiviert auch dendritische Zellen, die wiederum die TH1-Zell-Antwort induzieren.

4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass das Molekül CD44s ubiquitär vorkommt und auf Blutlymphozyten in erhöhtem Maße exprimiert wird. Im Gegensatz dazu zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die CD44 Varianten Isoformen nur gering exprimiert werden. Trotz des unterschiedlichen Expressionsniveaus zeigte sich bei den Morbus Crohn Patienten im akuten Zustand eine signifikant geringere Expression der CD44 Varianten Isoformen, die auf die durchgeführte Therapie zurückgeführt werden kann.

Im Falle des CD44-Liganden Osteopontin war eine klare Differenzierung zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa aufgrund der ermittelten Osteopontinexpression auf der Oberfläche peripherer Blutlymphozyten nicht möglich. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen darauf schließen, dass Osteopontin nicht an der Zelloberfläche reguliert, sondern intrazellulär insbesondere in dendritischen Zellen gebildet wird. Die bei Morbus Crohn, jedoch nicht bei Colitis ulcerosa Patienten, festgestellte positive Korrelation zwischen der Osteopontinkonzentration im Serum und dem Verlauf der Erkrankung bestätigt die immunmodulatorische Rolle von Osteopontin sowie seine Beteiligung an einer TH1-Immunantwort bei Morbus Crohn Patienten. Die ausgeprägte Sekretion von Osteopontin bei Morbus Crohn Patienten wirkt womöglich regulatorisch auf die Zellen des angeborenen Immunsystems des Darmes und kann mit der Gewebereparatur bzw. dem Erhalt der epithelialen Barriere durch Hemmung der Apoptose und Schützen der Epithelialzellen im Falle einer Entzündung in Verbindung gebracht werden; ausserdem könnte Osteopontin durch seine Fähigkeit Makrophagen zu binden und die Phagozytose zu steigern zur Wundheilung beitragen.

Die Erkenntnisse dieser Studie lassen nur beschränkt Rückschlüsse auf eine mögliche Einführung eines CD44 Varianten Isoformen Antikörpers in die Klinik als spezifische Zielstruktur in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu. Allerdings würde der Einsatz von CD44v monoklonalen Antikörpern als Marker in der klinischen Diagnostik von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen folgende Vorteile mit sich bringen: kostengünstiges Diagnoseverfahren und weniger Belastung für die Patienten. Aufgrund der relativ niedrigen Expression im Blut sind CD44 Variante Isoformen nur schwer oder kaum als Marker verwendbar. Aufgrund der publizierten Ergebnisse an Patientenzellen und im Tiermodell sind Antikörper gegen die CD44 Variante v7 jedoch hocheffektiv zur Unterdrückung einer Immunantwort, gezeigt sowohl in vivo im Tiermodell (Wittig *et al.* 1998) als auch in mononukleären Zellen des Darm von Crohn Patienten in vitro (Hoffmann *et al.* 2007). Solange es keine funktionellen Daten zu Osteopontin bei der Immunantwort im Darm gibt, kann eine klinische Anwendung von Osteopontin als Marker in der Diagnostik von Morbus Crohn sinnvoll sein.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von CD44 Varianten Isoformen (CD44s, v4, v6 und v7) und Osteopontin (OPN) bei Patienten mit Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) zu ermitteln und die Korrelation mit dem Krankheitsverlauf zu analysieren. Untersucht wurden die Oberflächenexpression dieser Moleküle auf LPMZ und PBMZ von Patienten und Probanden, sowie die OPN-Konzentration im Serum. Weiterhin wurde eine Proliferations- und Western-Blot-Analyse durchgeführt. Naive und mitogen stimulierte Monozyten wurden Immunfluoreszenz gefärbt. Anschliessend wurden Zelloberflächenmarker und die Zellproliferation durchflusszytometrisch analysiert. Der OPN-Nachweis erfolgte im Western Blot während die OPN-Sekretion in Serumproben und in Zellkulturüberständen mittels ELISA untersucht wurde. Es zeigte sich bei akuten MC Patienten eine signifikante Herabregulation der Frequenz positiver Zellen von CD44s, v4, v6 und v7 gegenüber Patienten in Remission und Probanden. Die OPN-Expression durch PBMZ im Western-Blot war höher bei MC als bei CU Patienten und diejenige durch LPMZ wies bei MC Patienten eine deutliche Intensitätserhöhung mit steigendem CDAI auf. Die OPN-Konzentration im Serum war höher bei MC als bei CU Patienten und bei Gesunden. Nur bei MC Patienten zeigte sich eine signifikante, positive Korrelation zwischen OPN-Konzentration und Aktivitätsindex. Bezogen auf den Zelltyp wiesen dendritische Zellen von MC Patienten die höchste OPN-Sekretion auf. Diese Arbeit bestätigt die ubiquitäre Eigenschaft von CD44s und weist auf eine intrazelluläre Bildung von OPN sowie auf ihre immunmodulatorische Wirkung und Beteiligung an der TH1-Immunantwort bei MC Patienten hin. Die ausgeprägte OPN-Sekretion bei MC Patienten kann mit der Gewebereparatur und der Wundheilung in Verbindung gebracht werden. Die Einführung eines CD44 Varianten Isoformen Antikörpers als spezifische Zielstruktur in der Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erscheint nur beschränkt möglich. OPN als Marker in der

klinischen Diagnostik von MC kann jedoch sinnvoll sein, solange es keine funktionellen Daten zu OPN bei der Immunantwort im Darm gibt.

Literaturverzeichnis

Abel B, Freigang S, Bachmann MF, Boschert U und Kopf M (2005): Osteopontin is not required for the development of Th1 responses and viral immunity. *J Immunol* 175(9): 6006-13.

Arch R, Wirth K, Hofmann M, Ponta H, Matzku S, Herrlich P und Zoller M (1992): Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* 257(5070): 682-5.

Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB und Seed B (1990): CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61(7): 1303-13.

Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ und Cantor H (2000): Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 287(5454): 860-4.

Bendeck MP, Irvin C, Reidy M, Smith L, Mulholland D, Horton M und Giachelli CM (2000): Smooth muscle cell matrix metalloproteinase production is stimulated via alpha(v)beta(3) integrin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(6): 1467-72.

Best WR, Bechtel JM und Singleton JW (1979): Rederived values of the eight coefficients of the Crohn's Disease Activity Index (CDAI). *Gastroenterology* 77(4 Pt 2): 843-6.

Brandtzaeg P, Bjerke K, Kett K, Kvale D, Rognum TO, Scott H, Sollid LM und Valnes K (1987): Production and secretion of immunoglobulins in the gastrointestinal tract. *Ann Allergy* 59(5 Pt 2): 21-39.

Brown LF, Berse B, Van de Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Manseau EJ, Dvorak HF und Senger DR (1992): Expression and distribution of

osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* 3(10): 1169-80.

Camacho FI, Munoz C, Sanchez-Verde L, Saez AI, Alcantara M und Rodriguez R (1999): CD44v6 expression in inflammatory bowel disease is associated with activity detected by endoscopy and pathological features. *Histopathology* 35(2): 144-9.

Chabas D (2005): [Osteopontin, a multi-faceted molecule]. *Med Sci (Paris)* 21(10): 832-8.

Cichy J und Pure E (2003): The liberation of CD44. *J Cell Biol* 161(5): 839-43.

Dalchau R, Kirkley J und Fabre JW (1980): Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. *Eur J Immunol* 10(10): 737-44.

DeGrendele HC, Estess P und Siegelman MH (1997): Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 278(5338): 672-5.

Denhardt DT, Giachelli CM und Rittling SR (2001a): Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 723-49.

Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS, Giachelli CM und Rittling SR (2001b): Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *J Clin Invest* 107(9): 1055-61.

Denning SM, Telen MJ, Hale LP, Lias HX und Haynes BF (1995). CD44 and CD44R-Cluster report. Schlossmann S eLT. Oxford, New York, Tokyo, Oxford University press: Pp 1713-1719.

Duchmann R, Hoffmann J, Marth T, Schneider T, Stallmach A und Zeitz M (1999). Mukosales Immunsystem im Darm - Immunologische Grundlagen chronisch

entzündlicher Darmkrankungen und der HIV-induzierten Enteropathie. *Magazin Forschung - Universität des Saarlandes*. 1: 47-65.

Ekbohm A, Helmick C, Zack M und Adami HO (1990): Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 323(18): 1228-33.

Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS und Riddell RH (1995): Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109(4): 1344-67.

Farkas S, Hornung M, Sattler C, Anthuber M, Gunthert U, Herfarth H, Schlitt HJ, Geissler EK und Wittig BM (2005): Short-term treatment with anti-CD44v7 antibody, but not CD44v4, restores the gut mucosa in established chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 142(2): 260-7.

Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF und Fedarko NS (2001): Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 280(2): 460-5.

Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C und Strober W (1996): Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 157(3): 1261-70.

Gassler N, Autschbach F, Gauer S, Bohn J, Sido B, Otto HF, Geiger H und Obermuller N (2002): Expression of osteopontin (Eta-1) in Crohn disease of the terminal ileum. *Scand J Gastroenterol* 37(11): 1286-95.

Gilfillan MC, Noel PJ, Podack ER, Reiner SL und Thompson CB (1998): Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. *J Immunol* 160(5): 2180-7.

Gunthert U, Schwarzler C, Wittig B, Laman J, Ruiz P, Stauder R, Bloem A, Smadja-Joffe F, Zoller M und Rolink A (1998): Functional involvement of CD44, a family of cell adhesion molecules, in immune responses, tumour progression and haematopoiesis. *Adv Exp Med Biol* 451: 43-9.

Herold G (2007). *Innere Medizin 2007. Eine vorlesungsorientierte Darstellung - mit ICD 10-Schlüssel*, Herold.

Herring GM (1976): A comparison of bone matrix and tendon with particular reference to glycoprotein content. *Biochem J* 159(3): 749-55.

Herring GM und Kent PW (1963): Some Studies on Mucosubstances of Bovine Cortical Bone. *Biochem J* 89: 405-14.

Hoffmann U, Heilmann K, Hayford C, Stallmach A, Wahnschaffe U, Zeitz M, Gunthert U und Wittig BM (2007): CD44v7 ligation downregulates the inflammatory immune response in Crohn's disease patients by apoptosis induction in mononuclear cells from the lamina propria. *Cell Death Differ* 14(8): 1542-51.

Hwang SM, Lopez CA, Heck DE, Gardner CR, Laskin DL, Laskin JD und Denhardt DT (1994): Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 269(1): 711-5.

Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS und Kasper DL (1995). *Harrisons Innere Medizin 2*. Berlin, Blackwell Wissenschafts-Verlag.

Jess T, Gomborg M, Matzen P, Munkholm P und Sorensen TI (2005): Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Am J Gastroenterol* 100(12): 2724-9.

Kasper D, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D und Jameson J (2005). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-hill.

Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, Herrlich P, Hotta H, Tanaka K, Chikuma S, Yagita H, Okumura K, Murakami M, Saiki I, Chambers AF und Uede T (1999): CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res* 59(1): 219-26.

Kishimoto K, Dong VM, Issazadeh S, Fedoseyeva EV, Waaga AM, Yamada A, Sho M, Benichou G, Auchincloss H, Jr., Grusby MJ, Khoury SJ und Sayegh MH (2000): The role of CD154-CD40 versus CD28-B7 costimulatory pathways in regulating allogeneic Th1 and Th2 responses in vivo. *J Clin Invest* 106(1): 63-72.

Koguchi Y, Kawakami K, Kon S, Segawa T, Maeda M, Uede T und Saito A (2002): *Penicillium marneffei* causes osteopontin-mediated production of interleukin-12 by peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 70(3): 1042-8.

Krettek A, Sukhova GK, Schonbeck U und Libby P (2004): Enhanced expression of CD44 variants in human atheroma and abdominal aortic aneurysm: possible role for a feedback loop in endothelial cells. *Am J Pathol* 165(5): 1571-81.

Kubo M, Yamashita M, Abe R, Tada T, Okumura K, Ransom JT, Nakayama T, Gilfillan MC, Noel PJ, Podack ER, Reiner SL und Thompson CB (1999): CD28 costimulation accelerates IL-4 receptor sensitivity and IL-4-mediated Th2 differentiation. Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. *J Immunol* 163(5): 2432-42.

Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K und Muller W (1993): Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75(2): 263-74.

Lin YH, Huang CJ, Chao JR, Chen ST, Lee SF, Yen JJ und Yang-Yen HF (2000): Coupling of osteopontin and its cell surface receptor CD44 to the cell survival response elicited by interleukin-3 or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Mol Cell Biol* 20(8): 2734-42.

Lin YH und Yang-Yen HF (2001): The osteopontin-CD44 survival signal involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Biol Chem* 276(49): 46024-30.

Mackay CR, Terpe HJ, Stauder R, Marston WL, Stark H und Gunthert U (1994): Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol* 124(1-2): 71-82.

Masuda H, Takahashi Y, Asai S und Takayama T (2003): Distinct gene expression of osteopontin in patients with ulcerative colitis. *J Surg Res* 111(1): 85-90.

Mulder JW, Kruyt PM, Sewnath M, Oosting J, Seldenrijk CA, Weidema WF, Offerhaus GJ und Pals ST (1994): Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *Lancet* 344(8935): 1470-2.

Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Kreiner S und Binder V (1992): Incidence and prevalence of Crohn's disease in the county of Copenhagen, 1962-87: a sixfold increase in incidence. *Scand J Gastroenterol* 27(7): 609-14.

Nagai S, Hashimoto S, Yamashita T, Toyoda N, Satoh T, Suzuki T und Matsushima K (2001): Comprehensive gene expression profile of human activated T(h)1- and T(h)2-polarized cells. *Int Immunol* 13(3): 367-76.

Naor D, Sionov RV und Ish-Shalom D (1997): CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 71: 241-319.

Nau GJ, Liaw L, Chupp GL, Berman JS, Hogan BL und Young RA (1999): Attenuated host resistance against *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice lacking osteopontin. *Infect Immun* 67(8): 4223-30.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F und Riccardi C (1991): A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139(2): 271-9.

O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, Goetschkes M, Mulligan N und Berman JS (1999): Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol* 162(2): 1024-31.

O'Regan AW, Hayden JM, Berman JS, Chupp GL, Lowry JA, Goetschkes M und Mulligan N (2000): Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Leukoc Biol* 68(4): 495-502.

Oriishi T, Sata M, Toyonaga A, Sasaki E und Tanikawa K (1995): Evaluation of intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease using lactulose and measuring antibodies to lipid A. *Gut* 36(6): 891-6.

Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F und Romagnani S (1997): Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 150(3): 823-32.

Patarca R, Saavedra RA und Cantor H (1993): Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit Rev Immunol* 13(3-4): 225-46.

Pfister K, Wittig BM, Mueller-Molaian I, Remberger K, Zeitz M und Stallmach A (2001): Decreased CD44v6 expression in lamina propria lymphocytes of patients with inflammatory bowel disease. *Exp Mol Pathol* 71(3): 186-93.

Piront P, Louis E, Latour P, Plomteux O und Belaiche J (2002): Epidemiology of inflammatory bowel diseases in the elderly in the province of Liege. *Gastroenterol Clin Biol* 26(2): 157-61.

Ponta H, Sherman L und Herrlich PA (2003): CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(1): 33-45.

Poppe D, Tiede I, Fritz G, Becker C, Bartsch B, Wirtz S, Strand D, Tanaka S, Galle PR, Bustelo XR und Neurath MF (2006): Azathioprine suppresses ezrin-radixin-moesin-dependent T cell-APC conjugation through inhibition of Vav guanosine exchange activity on Rac proteins. *J Immunol* 176(1): 640-51.

Potter MR, Rittling SR, Denhardt DT, Roper RJ, Weis JH, Teuscher C und Weis JJ (2002): Role of osteopontin in murine Lyme arthritis and host defense against *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 70(3): 1372-81.

Rachmilewitz D (1989): Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial. *Bmj* 298(6666): 82-6.

Renkl AC, Wussler J, Ahrens T, Thoma K, Kon S, Uede T, Martin SF, Simon JC und Weiss JM (2005): Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype. *Blood* 106(3): 946-55.

Rollo EE, Hempson SJ, Bansal A, Tsao E, Habib I, Rittling SR, Denhardt DT, Mackow ER und Shaw RD (2005): The cytokine osteopontin modulates the severity of rotavirus diarrhea. *J Virol* 79(6): 3509-16.

Rosenberg WM, Prince C, Kaklamanis L, Fox SB, Jackson DG, Simmons DL, Chapman RW, Trowell JM, Jewell DP und Bell JI (1995): Increased expression of CD44v6 and CD44v3 in ulcerative colitis but not colonic Crohn's disease. *Lancet* 345(8959): 1205-9.

Rulifson IC, Sperling AI, Fields PE, Fitch FW und Bluestone JA (1997): CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J Immunol* 158(2): 658-65.

Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC und Horak I (1993): Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 75(2): 253-61.

Sato T, Nakai T, Tamura N, Okamoto S, Matsuoka K, Sakuraba A, Fukushima T, Uede T und Hibi T (2005): Osteopontin/Eta-1 upregulated in Crohn's disease regulates the Th1 immune response. *Gut* 54(9): 1254-62.

Schmits R, Filmus J, Gerwin N, Senaldi G, Kiefer F, Kundig T, Wakeham A, Shahinian A, Catzavelos C, Rak J, Furlonger C, Zakarian A, Simard JJ, Ohashi PS, Paige CJ, Gutierrez-Ramos JC und Mak TW (1997): CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood* 90(6): 2217-33.

Schreiber RA und Walker WA (1988): The gastrointestinal barrier: antigen uptake and perinatal immunity. *Ann Allergy* 61(6 Pt 2): 3-12.

Sodek J, Ganss B und McKee MD (2000): Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 11(3): 279-303.

Tao X, Constant S, Jorritsma P, Bottomly K, Kubo M, Yamashita M, Abe R, Tada T, Okumura K, Ransom JT, Nakayama T, Gilfillan MC, Noel PJ, Podack ER, Reiner SL und Thompson CB (1997): Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation. CD28 costimulation accelerates IL-4 receptor sensitivity and IL-4-mediated Th2 differentiation. Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. *J Immunol* 159(12): 5956-63.

Tolg C, Hofmann M, Herrlich P und Ponta H (1993): Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res* 21(5): 1225-9.

van Dijk S, D'Errico JA, Somerman MJ, Farach-Carson MC und Butler WT (1993): Evidence that a non-RGD domain in rat osteopontin is involved in cell attachment. *J Bone Miner Res* 8(12): 1499-506.

Wang X, Louden C, Yue TL, Ellison JA, Barone FC, Solleveld HA und Feuerstein GZ (1998): Delayed expression of osteopontin after focal stroke in the rat. *J Neurosci* 18(6): 2075-83.

Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ und Cantor H (1996): Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 271(5248): 509-12.

Weber GF, Zawaideh S, Hikita S, Kumar VA, Cantor H und Ashkar S (2002): Phosphorylation-dependent interaction of osteopontin with its receptors regulates macrophage migration and activation. *J Leukoc Biol* 72(4): 752-61.

Weg-Remers S, Anders M, von Lampe B, Riecken EO, Schuder G, Feifel G, Zeitz M und Stallmach A (1998): Decreased expression of CD44 splicing variants in advanced colorectal carcinomas. *Eur J Cancer* 34(10): 1607-11.

Wittig B, Johansson B, Zoller M, Schwarzler C und Gunthert U (2000): Abrogation of experimental colitis correlates with increased apoptosis in mice deficient for CD44 variant exon 7 (CD44v7). *J Exp Med* 191(12): 2053-64.

Wittig B, Schwarzler C, Fohr N, Gunthert U und Zoller M (1998): Curative treatment of an experimentally induced colitis by a CD44 variant V7-specific antibody. *J Immunol* 161(3): 1069-73.

Wittig B, Seiter S, Schmidt DS, Zuber M, Neurath M und Zoller M (1999): CD44 variant isoforms on blood leukocytes in chronic inflammatory bowel disease and other systemic autoimmune diseases. *Lab Invest* 79(6): 747-59.

Wittig B, Stallmach A und Zeitz M (2005): Innovative Therapieformen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Was ist dazu gekommen? Die Medizinische Welt 56: 313-18.

Wittig B, Stallmach A, Zeitz M und Gunthert U (2002): Functional involvement of CD44 variant 7 in gut immune response. Pathobiology 70(3): 184-9.

Zohar R, Suzuki N, Suzuki K, Arora P, Glogauer M, McCulloch CA und Sodek J (2000): Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration. J Cell Physiol 184(1): 118-30.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1: Links: Befallsmuster bei Morbus Crohn mit Ausdehnung von proximal nach distal. Rechts: Befallsmuster bei Colitis ulcerosa mit Ausdehnung im Kolon von distal nach proximal. 4
- Abbildung 2: Schematische Darstellung der Genstruktur von CD44 modifiziert nach Godison et al. Durchnummeriert sind die Exons. ER: Extrazelluläre Region, TM: entspricht der transmembranen Domäne. ZR: Zytoplasmatische Region. HR: Hypervariable Region..... 9
- Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur des Osteopontins modifiziert von Dehhardt und Mitarbeiter(Denhardt et al. 2001a) nach einer Darstellung von Sodek und Mitarbeiter (Sodek et al. 2000): Die Grossbuchstaben stellen die Aminosäure dar, während die Kleinbuchstaben für die konservierten Aminosäuren stehen. RGD: Arginin Glutamin Aspartat.NH₂: Aminoterminus; COOH: Carboxyterminus. 10
- Abbildung 4: Prinzip der Ficoll-Trennmethode: Aus Frischblut werden periphere Blutlymphozyten nach Zentrifugation von weiteren Blutbestandteilen (Granulozyten, Erythrozyten) getrennt und in der Interphase angesammelt. 18
- Abbildung 5: Gegenüberstellung der Oberflächenexpression drei verschiedener CD44-Standard Antikörper jeweils vor und nach mitogener Stimulation in vitro mit PHA..... 27
- Abbildung 6: Oberflächenexpression von CD44-Standard auf naiven Zellen von MC und CU Patienten. Vergleich der Gruppen der Erkrankten (unterteilt in akuten und Remissionszustand) und der Gesunden. * p=0.0067. 28
- Abbildung 7: Oberflächenexpression von CD44-Standard auf Zellen von MC und CU Patienten nach in vitro mitogener Stimulation. Vergleich der Gruppen

- der Erkrankten (unterteilt in akuten und Remissionszustand) und der Gesunden..... 29
- Abbildung 8: Oberflächenexpression von CD44 Varianten Isoformen auf naiven Zellen von MC Patienten. Vergleich der Gruppen der Erkrankten (unterteilt in akuten und Remissionszustand) und der Gesunden.* $p=0.0022$; ** $P=0.0367$; *** $p=0.0537$ 30
- Abbildung 9: Oberflächenexpression von CD44 Varianten Isoformen auf Zellen von MC Patienten nach in vitro mitogener Stimulation. Vergleich der Gruppen der Erkrankten (unterteilt in akutem und Remissionszustand) und der Gesunden..... 31
- Abbildung 10: Oberflächenexpression von CD44 Varianten Isoformen auf naiven Zellen von CU Patienten. Vergleich zwischen Erkrankten und Gesunden..... 32
- Abbildung 11: Oberflächenexpression von CD44 Varianten Isoformen auf Zellen von CU Patienten nach mitogener Stimulation. Vergleich zwischen Erkrankten und Gesunden. 32
- Abbildung 12: Oberflächenexpression von Osteopontin auf naiven Zellen von MC und CU Patienten. Verglichen wurden die ermittelten Werte der Erkrankten (unterteilt in akuten und Remissionszustand) mit denen der gesunden Probanden..... 33
- Abbildung 13: Oberflächenexpression von Osteopontin auf Zellen von MC und CU Patienten nach in vitro mitogener Stimulation mit PHA. Verglichen wurden die ermittelten Werte der Erkrankten (unterteilt in akuten und Remissionszustand) mit denen der gesunden Probanden. 34
- Abbildung 14: A: Expression (kD, Kilo Dalton) von Osteopontin durch PBMZ bei aktiven und inaktiven Patienten und bei gesunden Probanden. B: Expression durch LPMZ bei Morbus Crohn Patienten in Abhängigkeit

vom Crohn Disease Activity Index. MW: Molecular Weight (Molekulargewicht).	35
Abbildung 15: Osteopontinkonzentration im Serum von aktiven Patienten mit Morbus Crohn (CDAI>150), Colitis ulcerosa (CAI>4), im Vergleich mit Diverticulitis Patienten und gesunden Probanden.....	36
Abbildung 16: Darstellung der Osteopontinkonzentration bei allen untersuchten Patienten, sortiert nach Krankheit und Krankheitsaktivität.	37
Abbildung 17: Korrelation zwischen der Osteopontinkonzentration im Serum und der Krankheitsaktivität. Eine Erhöhung des Crohn Disease Activity Indexes (CDAI) führt zu einer Erhöhung der Osteopontinkonzentration im Serum. r: Pearson correlation coefficient, p: Signifikanzniveau.....	38
Abbildung 18: Abhängigkeit der Osteopontinkonzentration im Serum von der Krankheitsaktivität. Eine Erhöhung des Colitis Disease Indexes (CAI) führt zu keiner signifikanten Änderung der Osteopontinkonzentration im Serum. r: Pearson correlation coefficient, p: Signifikanzniveau....	39
Abbildung 19: Darstellung der Osteopontinkonzentration in verschiedenen Zelltypen bei Morbus Crohn Patienten und bei gesunden Probanden. Mono: Monozyten, DC: Dendritische Zellen.	40
Abbildung 20: Repräsentative Muster der Analyse der Zellproliferation mittels CFSE in vitro (A) und der Apoptose nach Nicoletti (B). T-Zellen und dendritische Zellen wurden vor der Inkubation mit Osteopontin CFSE-markiert. PI: Propidiumjodid.	41
Tabelle 1: Unterscheidungsmerkmale zwischen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn.	2
Tabelle 2: Patientenkollektiv und Kontrollgruppen.....	16
Tabelle 3: Verwendete Antikörper	20

Anhang

A-I Werte der Oberflächenexpression auf peripheren Blutlymphozyten bei Morbus Crohn Patienten

	Färbung	naiv	stimuliert	CDAI
1	P052 weniger aktiver MC			200
	CD44std	94.09	48.44	
	CD44v4	2.22	1.24	
	CD44v6	1.64	3.48	
	CD44v7	2.01	1.14	
	OPN		1.84	
2	P001 MC Remission			75
	CD44std	93.66	40.02	
	CD44v4	1.62	0.87	
	CD44v6	1.15	0.41	
	CD44v7	1.3	0.23	
	OPN			
3	P059 MC wenig aktiv			200
	CD44std	71.24	40.52	
	CD44v4	0.79	0.7	
	CD44v6	0.82	1.91	
	CD44v7	0.95	1.91	
	OPN	0.33	1.06	
4	P060 MC, Remission			75
	CD44std	49.67	43.76	
	CD44v4	1.67	1.49	
	CD44v6	0.65	2.17	
	CD44v7	0.69	2.17	
	OPN	0.3	2.05	
5	P081 MC, akut			300
	CD44std	30.01	14.74	
	CD44v4	0.6	2.31	
	CD44v6	0.54	1.53	
	CD44v7	0.43	1.74	
	OPN	0.13	0.1	
6	P084 MC, akut			210
	CD44std	11.12	78.54	
	CD44v4	0.21	0.42	
	CD44v6	0.11	0.06	

	CD44v7	0.19	0.16	
	OPN			
7	P086 MC, Akut			300
	CD44std	33.12	32.13	
	CD44v4	0.06	0.35	
	CD44v6	0.05	0.07	
	CD44v7	0.09	0.14	
	OPN			
8	P087 MC, akut			250
	CD44std	65.62	71.71	
	CD44v4	0.24	0.2	
	CD44v6	0.21	0.04	
	CD44v7	0.38	0.15	
	OPN			
9	P092 MC, Remission			75
	CD44std	98.57	98.58	
	CD44v4	0.81	1.52	
	CD44v6	0.74	1.01	
	CD44v7	1.59	0.84	
	OPN	4.31	1.13	
10	P095 MC, Remission			
	CD44std	98.42	48.34	180
	CD44v4	8.43	3.3	
	CD44v6	3.36	0.5	
	CD44v7	5.16	1.25	
	OPN	6.96	1.07	
11	P144 MC Akut			250
	CD44std	71.75	10.4	
	CD44v4	0.94	1	
	CD44v6	0.5	0.61	
	CD44v7	0.66	0.63	
	OPN	1.09	3.02	
12	P146 MC Remission			
	CD44std	96.35	55.15	
	CD44v4	2.19	1.47	
	CD44v6	0.83	2.43	
	CD44v7	1.46	1.12	
	OPN	1.54	4.75	
	ALLE			
MW	Färbung	naiv	stimuliert	
	CD44std	70.32	47.01	
	CD44v4	1.93	1.46	
	CD44v6	0.90	1.17	

	CD44v7	1.26	1.31	
	OPN MC	2.64	2.24	
SD	Färbung	naiv	stimuliert	
	CD44std	28.06	24.32	
	CD44v4	1.97	0.84	
	CD44v6	0.79	0.94	
	CD44v7	1.21	1.12	
	OPN	3.16	2.17	
	AKUT			
MW	Färbung	naiv	stimuliert	
	CD44std	42.32	41.50	
	CD44v4	0.41	0.86	
	CD44v6	0.28	0.46	
	CD44v7	0.35	0.56	
	OPN MC	0.61	1.56	
SD	Färbung	naiv	stimuliert	
	CD44std	25.59	31.84	
	CD44v4	0.36	0.87	
	CD44v6	0.23	0.64	
	CD44v7	0.22	0.69	
	OPN	0.68	2.06	
	REMISSION			
MW	Färbung	naiv	stimuliert	
	CD44std	86.00	53.54	
	CD44v4	2.53	1.51	
	CD44v6	1.31	1.70	
	CD44v7	1.88	1.24	
	OPN MC	2.69	1.98	
SD	Färbung	naiv	stimuliert	
	CD44std	18.62	20.54	
	CD44v4	2.66	0.85	
	CD44v6	0.96	1.12	
	CD44v7	1.51	0.65	
	OPN	2.89	1.42	

A-II Werte der Oberflächenexpression auf peripheren Blutlymphozyten bei Colitis ulcerosa Patienten

	Färbung	naiv	stimuliert	CAI
1	P051 Colitis Remission			3
	CD44std	96.82		
	CD44v4	3.96		
	CD44v6	5.83		
	CD44v7	1.37		
	OPN	2.61		
2	P002 CU			2
	CD44std	83.8	97.62	
	CD44v4	1.09	6.42	
	CD44v6	1.07	6.29	
	CD44v7	1	3.89	
	OPN			
3	P085 CU mässig			8
	CD44std	39.82	60.64	
	CD44v4	0.2	2.2	
	CD44v6	0.14	1.19	
	CD44v7	0.25	1.17	
	OPN			
4	P083 CU			
	CD44std	56.84	82.2	
	CD44v4	0.89	0.69	
	CD44v6	0.76	0.25	
	CD44v7	0.63	0.38	
	OPN			
5	P093 CU			5
	CD44std	94.57	53.88	
	CD44v4	1.84	0.31	
	CD44v6	1.56	0.25	
	CD44v7	2	0.34	
	OPN	1.84	1.38	
6	P106 CU, Remission			3
	CD44std	97.69	87.37	
	CD44v4	1.26	0.49	
	CD44v6	0.69	0.46	
	CD44v7	0.94	0.43	
	OPN	1.69	0.75	
7	P107 CU, akuter Schub Aza Ther			10
	CD44std	94.8	89.66	

	CD44v4	1.72	1.75	
	CD44v6	0.82	2.47	
	CD44v7	1.17	1.95	
	OPN	4.89	0.43	
8	P110 CU wenig aktiv			4
	CD44std	92.33	70.42	
	CD44v4	3.5	3.03	
	CD44v6	1.99	1.59	
	CD44v7	2.5	1.28	
	OPN	2.31	2.05	
9	P112 CU aktiver Schub			10
	CD44std	97.28	56.12	
	CD44v4	1.83	0.44	
	CD44v6	0.97	0.16	
	CD44v7	1.68	0.07	
	OPN	5.54	0.26	
10	P117 CU starke Aktivität			10
	CD44std	78.69	62.09	
	CD44v4	2.35	1.47	
	CD44v6	1.97	0.77	
	CD44v7	2.15	1.18	
	OPN	3.72	2.33	
11	P120 CU akuter Schub			10
	CD44std	95.91	53.08	
	CD44v4	3.45	1.17	
	CD44v6	1.34	0.39	
	CD44v7	2.29	0.71	
	OPN		6.11	
12	P145 CU akuter Schub			14
	CD44std	76.55	18.34	
	CD44v4	1.66	1.01	
	CD44v6	0.98	1.12	
	CD44v7	0.95	1.63	
	OPN	0.88	3.85	
13	P147 CU akuter Schub			8
	CD44std	84.18	65.78	
	CD44v4	1.42	2.54	
	CD44v6	0.8	1.26	
	CD44v7	1.26	1.93	
	OPN	2.04		
	ALLE			
MW	Färbung	naiv	stimuliert	

	CD44std	81.73	67.22	
	CD44v4	2.71	1.99	
	CD44v6	1.35	1.49	
	CD44v7	1.29	1.25	
	OPN CU	3.85	1.84	
SD	Färbung	naiv	stimuliert	
	CD44std	22.97	21.25	
	CD44v4	3.34	1.80	
	CD44v6	1.29	1.64	
	CD44v7	0.70	1.01	
	OPN	6.01	1.88	
	AKUT			
MW	Färbung	naiv	stimuliert	
	CD44std	87.90	62.43	
	CD44v4	2.07	1.92	
	CD44v6	1.15	1.34	
	CD44v7	1.58	1.36	
	OPN CU	3.41	2.34	
SD	Färbung	naiv	stimuliert	
	CD44std	9.24	24.81	
	CD44v4	0.74	1.53	
	CD44v6	0.45	1.12	
	CD44v7	0.55	0.74	
	OPN	1.94	2.28	
	REMISSION			
MW	Färbung	naiv	stimuliert	
	CD44std	82.36	72.81	
	CD44v4	1.82	1.91	
	CD44v6	1.72	1.08	
	CD44v7	1.24	0.96	
	OPN CU	2.11	1.40	
SD	Färbung	naiv	stimuliert	
	CD44std	21.94	13.52	
	CD44v4	1.40	1.30	
	CD44v6	1.91	0.57	
	CD44v7	0.78	0.46	
	OPN	0.42	0.92	

A-III Werte der Oberflächenexpression auf peripheren Blutlymphozyten bei gesunden Probanden

	Färbung	naiv	stimuliert
1	K19 gesund		
	CD44std	67.52	59.21
	CD44v4	2.76	0.8
	CD44v6	2.06	0.44
	CD44v7	1.62	2.05
	OPN	3.3	3.16
2	K20 gesund		
	CD44std	56.81	62.18
	CD44v4	3.45	1.33
	CD44v6	1.74	0.72
	CD44v7	2.74	2.61
	OPN	1.5	5.7
3	K21 gesund		
	CD44std	46.75	68.58
	CD44v4	2.56	0.87
	CD44v6	0.87	0.35
	CD44v7	1.27	1.3
	OPN	2.1	4.15
4	K22 gesund		
	CD44std	31.6	59.88
	CD44v4	1.58	0.39
	CD44v6	0.89	0.18
	CD44v7	1.06	0.69
	OPN	1.65	1.41
5	K23 gesund		
	CD44std	95.98	73.69
	CD44v4	3.75	0.77
	CD44v6	1.34	0.39
	CD44v7	1.89	0.25
	OPN	1.25	0.56
6	K28 gesund		
	CD44std	80.8	78.52
	CD44v4	2.15	3.74
	CD44v6	1.4	2.69
	CD44v7	2.25	3.07
	OPN	2.41	1.1

7	K29 gesund		
	CD44std	90.99	69.5
	CD44v4	3.32	8.09
	CD44v6	1.52	8.42
	CD44v7	2.16	4.61
	OPN	2.04	7.38
8	K30 gesund		
	CD44std	71.18	92.94
	CD44v4	2.31	5.85
	CD44v6	1.76	1.61
	CD44v7	2.1	4.3
	OPN	5.75	1.4
9	K31 gesund		
	CD44std	85.34	71.66
	CD44v4	1.87	3.46
	CD44v6	0.72	1.49
	CD44v7	1.57	2.7
	OPN	1.52	2.34
10	K32 gesund		
	CD44std	87.48	89.07
	CD44v4	1.74	1.93
	CD44v6	1.33	1.21
	CD44v7	1.9	1.6
	OPN		
MW	Färbung	naiv	stimuliert
	CD44std	71.45	72.52
	CD44v4	2.55	2.72
	CD44v6	1.36	1.75
	CD44v7	1.86	2.32
	OPN	2.39	3.02
SD	Färbung	naiv	stimuliert
	CD44std	20.95	11.53
	CD44v4	0.76	2.56
	CD44v6	0.43	2.47
	CD44v7	0.50	1.43
	OPN	1.40	2.32

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Elianne Kassi, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *„Expression von CD44 Varianten Isoformen und des Liganden Osteopontin bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen“* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin

Elianne Kassi

Danksagung

Diese Arbeit konnte nur durch eine vielseitige Unterstützung zustande kommen.

Dafür danke ich zunächst Herrn Professor Dr. med Martin Zeitz für die Möglichkeit, in der Medizinischen Klinik I der Charité, Campus Benjamin Franklin, wissenschaftlich arbeiten zu können. Mein besonderer Dank gilt zudem Frau PD Dr. med Bianca M. Wittig für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung dieser Arbeit und die wertvollen Hilfestellungen in fachlicher und persönlicher Hinsicht. Für die gewährte finanzielle Unterstützung dieser Dissertation durch ein Forschungsstipendium der Charité möchte ich mich auch bei den Trägern bedanken.

Bei Frau Dr. Ute Hoffmann möchte ich mich für die Einführung in die Immunmodulation chronisch entzündlicher Darmerkrankungen und für die ständige Hilfe bedanken. Ein besonderer Dank gebührt ebenfalls Frau Dr. Katja Heilmann für die konstruktiven Kritiken und Anregungen bei der Fertigstellung des Manuskriptes. Für die labor-technische Begleitung dieser Arbeit, die grosse Hilfsbereitschaft und die vermittelte Freude und Ausdauer am wissenschaftlichen Arbeiten bin ich Frau Claudia Hayford zu besonderem Dank verpflichtet. Frau Dipl.-Biol. Pamela Holzlöhner für den fruchtbaren Gedankenaustausch und allen Mitarbeitern des Labors für die gute Arbeitsatmosphäre danke ich ganz herzlich.

Meinen liebevollen Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben, meinen Geschwistern, die immer an mich geglaubt und mir viel Vertrauen geschenkt haben, der Familie Zinkweg, die mich nicht nur finanziell sondern auch moralisch tatkräftig unterstützt hat, sowie allen meinen treuen Freunden danke ich vom ganzen Herzen.

Meinem aufopferungsvollen Ehemann, Jean-Pierre, der mir meine Promotion durch seine Geduld und sein Verständnis für die vielen, teilweise frustrierenden

Tagen, an denen ich an meiner Dissertation gearbeitet habe, aber auch durch sein strenges, wegweisendes Korrekturlesen ermöglicht hat, danke ich zutiefst.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.