

Aus der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie, Zentrum Innere Medizin
Direktor: Prof. Dr. med. M.P. Manns

**Vergleich der Expression und Freisetzung von
Transforming growth factor- β aus humanen eosinophilen
Granulozyten aus Blut und Darmmukosa**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin in der Medizinischen Hochschule
Hannover

vorgelegt von

Nicole Zimmermann

aus Hildesheim

Hannover, 2006

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover

Am 23.07.2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Dieter Bitter-Suermann

Betreuer: Prof. Dr. med. Stephan C. Bischoff

Referentin: PD Dr. Heike Nave

Korreferent: Prof. Dr. Jörn Elsner

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2007

Promotionsausschussmitglieder:

Prof. Dr. Alexander Kapp

Prof. Dr. Wippermann

Prof. Dr. Stefan Kubicka

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Einleitung.....	6
1.1. Immunsystem und lymphatisches System der Darmmukosa.....	6
1.2. Eosinophile Granulozyten.....	7
1.2.1. Allgemeines und Histologie der eosinophilen Granulozyten.....	7
1.2.2. Funktion der eosinophilen Granulozyten.....	7
1.2.3. Aktivierung der eosinophilen Granulozyten.....	10
1.2.4. Einwanderung von eosinophilen Granulozyten.....	10
1.2.5. Gastrointestinale eosinophile Granulozyten.....	11
1.2.6. Gastrointestinale Entzündungsreaktionen.....	12
1.3. Transforming growth factor β (TGF- β).....	13
1.3.1. Allgemeines und Funktion von TGF- β	13
1.3.2. Aktivierung von TGF- β	14
1.3.3. Die Isoform TGF- β 1.....	15
1.3.4. TGF- β 1 und eosinophile Granulozyten im Gastrointestinaltrakt.....	16
1.4. Zielsetzung.....	17
2. Materialien und Methoden.....	18
2.1. Materialien.....	18
2.1.1. Reagenzien und Puffer.....	18
2.1.2. Mediatormessung.....	20
2.1.3. Ribonukleinsäure(RNA)-Untersuchung.....	21
2.2. Methoden.....	21
2.2.1. Isolation von humanen eosinophilen Granulozyten aus peripherem Blut (mit und ohne Percoll-Dichtegradient).....	21
2.2.2. Anreicherung von eosinophilen Granulozyten aus peripherem venösen Blut durch magnetische Zellseparation.....	23
2.2.3. Isolation von humanen eosinophilen Granulozyten aus intestinaler Mukosa.....	24
2.2.4. Anreicherung von humanen eosinophilen Granulozyten aus intestinaler Mukosa durch magnetische Zellseparation.....	25
2.2.5. Aufbau der Stimulationsexperimente.....	26
2.2.6. Zellzählung und Differenzierung.....	26

2.2.7. RNA-Isolation und Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	27
2.2.8. Realtime-PCR.....	28
2.2.9. Westernblot.....	29
2.2.10. Statistik.....	30
3. Ergebnisse.....	31
3.1. Isolation und Aufreinigung von humanen eosinophilen Granulozyten	31
3.1.1. Isolation und Aufreinigung von humanen eosinophilen Granulozyten aus peripherem venösen Blut (mit und ohne Percoll-Dichtegradient)	31
3.1.2. Isolation und Aufreinigung von humanen eosinophilen Granulozyten aus Darmmukosa.....	36
3.2. Regulation der Mediatorexpression und -Freisetzung aus humanen eosinophilen Granulozyten aus Blut und Darmmukosa	39
3.2.1. Auswahl der Stimulanzen.....	39
3.2.2. Regulation der Freisetzung von eosinophilem kationischen Protein (ECP)	39
3.2.3. Regulation der Freisetzung von Leukotrien C ₄ (LTC ₄)	41
3.2.4. Regulation der Produktion und Freisetzung von TGF-β1	43
3.2.5. Expression der TGF-β-mRNA in eosinophilen Granulozyten aus Blut und Darmmukosa mittels Realtime-PCR.....	48
3.3. Charakterisierung der eosinophilen Granulozyten aus Blut und Darmmukosa anhand der mRNA-Expression mittels RT-PCR	50
3.3.1. Differentielle mRNA-Expression von Zytokinen	50
3.3.2. Differentielle mRNA-Expression von Chemokinen.....	51
4. Diskussion	53
4.1. Isolation und Anreicherung von eosinophilen Granulozyten aus Blut und Darmmukosa	53
4.2. Vergleich der Mediatorexpression und -Freisetzung aus humanen eosinophilen Granulozyten aus Blut und Darmmukosa	56
4.2.1. Regulation der Freisetzung von ECP und LTC ₄	56
4.2.2. TGF-β-Expression und -Freisetzung.....	57
4.3. Vergleich der mRNA-Expression von Zytokinen und Chemokinen	59
4.4. Ausblick.....	62
5. Zusammenfassung	63

6. Referenzen.....	65
7. Danksagung.....	74
8. Lebenslauf.....	75
9. Erklärung nach §2 Abs. 2 Nr. 5 und 6 PromO	76

Abkürzungsverzeichnis

BSA	bovines Rinderalbumin
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECP	eosinophil cationic protein
EDN	eosinophil-derived neurotoxin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EOB	eosinophile Granulozyten aus Blut
EOD	eosinophile Granulozyten aus Darmmukosa
EPO	eosinophil peroxidase
FCS	fetal calf serum
fMLP	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
HEPES	4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazine-N-2-ethanesulfonic acid
IFN- γ	Interferon- γ
IgA, -E, -G	Immunglobulin A, -E, -G
IL	Interleukin
LTC ₄	cysteinyl-Leukotrien C ₄
MACS	magnetic beads-activated cell sorting
MAdCAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule-1
MBP	major basic protein
MIP-1 α , -1 β	macrophage inflammatory protein-1 α , -1 β
MCP-1, -3	monocyte chemotactic protein-1, -3
MHC class-II	major histocompatibility complex class-II
mRNA	messenger-RNA
NGF	nerve growth factor
NK-Zellen	natural killer cells
NTC	no template control
RNA	Ribonukleinsäure
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAF	platelet activating factor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PGE ₁ , -E ₂	Prostaglandin E ₁ , -E ₂
RANTES	regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted (Chemokin)
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SCF	stem cell factor
TGF- α , - β	transforming growth factor- α , - β
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF- α	tumor necrosis factor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TXB ₂	Thromboxan B ₂
VIP	vasoactive intestinal peptide

1. Einleitung

1.1. Immunsystem und lymphatisches System der Darmmukosa

Das Immunsystem des Menschen besteht aus diversen Abwehrmechanismen. Es soll den Organismus vor Mikroorganismen, Fremdsubstanzen und eigenen Schadstoffen schützen. Wichtig ist dabei die Unterscheidung zwischen fremd und körpereigen [1;2]. Zum Immunsystem zählen die primären (Knochenmark) und sekundären lymphatischen Organe (Milz, Lymphknoten, Tonsillen, Thymus und lymphatische Gewebe der Schleimhäute) sowie immunreaktive Zellen (B- und T-Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen [natural killer cells]). Außerdem gehören die humoralen Immunfaktoren (Antikörper, Komplementsystem sowie Zytokine) dazu [2;3]. Es gibt die angeborene (unspezifische) und die erworbene (spezifische) Immunabwehr. Als unspezifische Immunzellen agieren Makrophagen, neutrophile Granulozyten und NK-Zellen. B- und T-Lymphozyten sind die Hauptbestandteile des spezifischen Immunsystems [2]. Der Gastrointestinaltrakt ist die primäre Fläche, an der viele Antigene kontinuierlich mit dem Immunsystem in Kontakt treten. Den lymphatischen Geweben der Schleimhäute kommt dabei eine entscheidende Rolle zu [4]. Die größte Oberfläche der gastrointestinalen Schleimhäute weist das Darmgewebe auf [5]. Als Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe wird der intestinale Bestandteil des lymphatischen Mukosagewebes bezeichnet [4]. Das intestinale Immunsystem besteht aus den Peyerschen Plaques, der Lamina propria und den intraepithelialen Anteilen [6]. Zusätzlich ist das Darmgewebe das größte Depot für eosinophile Granulozyten [7]. Eosinophile Granulozyten sind ein wichtiger Bestandteil des gastrointestinalen Immunsystems. Außerdem sind diese Zellen an der angeborenen, regulatorischen sowie entzündlichen Immunantwort beteiligt [6;8].

1.2. Eosinophile Granulozyten

1.2.1. Allgemeines und Histologie der eosinophilen Granulozyten

Die von Paul Ehrlich zum ersten Mal beschriebenen eosinophilen Granulozyten [9] zählen zu den Leukozyten des Blutes [10]. Im Blut sind $4 - 11 \cdot 10^9$ Leukozyten/l vorhanden. Eosinophile machen einen Anteil von 2 – 4% aus [4;10]. Die Bildung und Differenzierung der eosinophilen Granulozyten findet im Knochenmark unter Beeinflussung von IL(Interleukin)-5, weniger von IL-3 oder GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) statt [5;7]. Eosinophile zirkulieren nur teilweise im Blut, da sie hauptsächlich Gewebe-assoziiert vorliegen [5]. Es sind im Gewebe ungefähr 500 mal mehr Eosinophile als im Blut vorhanden [11].

Histologisch stellen sich die 12 – 15 μm großen eosinophilen Granulozyten mit einem zweisegmentigen Kern dar. Diese Granulozyten beinhalten viele Granula, die sich mit sauren Farbstoffen stark rot (eosinophil) anfärben lassen. Elektronenmikroskopisch sind v.a. die spezifischen (sekundären) Granula sichtbar. Diese Granula enthalten u.a. die eosinophilen spezifischen Proteine wie ECP (eosinophil cationic protein), EPO (eosinophil peroxidase) und EDN (eosinophil-derived neurotoxin). Der kristalloide Kern dieser Granula weist das MBP (major basic protein) auf. MBP ist vornehmlich für die eosinophile Anfärbbarkeit verantwortlich [1;2;7].

1.2.2. Funktion der eosinophilen Granulozyten

Eosinophile Granulozyten sind wichtige Effektorzellen bei Parasitosen, wirken antibakteriell sowie antiviral und können Antigen-Antikörperkomplexe phagozytieren [2;12;13]. Die Eosinophilen agieren als immunmodulatorische Zellen und können sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Wirkungen haben. Außerdem wirken Eosinophile gewebescheidend und haben einen entscheidenden Einfluss auf die allergische Entzündungsreaktion [12;14-17]. Ebenso sind diese Zellen an der Organmorphogenese beteiligt [7]. Eine abnorme Erhöhung der Eosinophilenanzahl (Eosinophilie) im Blut ist u.a. bei Parasitosen oder allergischen Erkrankungen nachweisbar. Auch Entzündungen, maligne Prozesse oder Pharmaka sind mit einer Eosinophilie assoziiert [11;18;19]. Neben der Eosinophilie im Blut ist bei allergischen und anderen Erkrankungen auch eine Eosinophilie im Gewebe

nachweisbar [7;10;15;19]. Unter nicht-pathologischen Bedingungen liegen eosinophile Gewebsgranulozyten vornehmlich in der Mukosa des Gastrointestinaltrakts vor [19]. Die Menge der normalerweise vorhandenen gastrointestinalen Eosinophilen ist jedoch geringer als unter pathologischen Gewebsbedingungen [13;20]. Proinflammatorische Mediatoren der Eosinophilen sind Zytokine, Chemokine sowie die basischen Proteine der eosinophilen Granula und Lipidmediatoren. Außerdem enthalten eosinophile Granulozyten oxygenierende Radikale und Proteasen [21]. Einige wichtige eosinophile Mediatoren sind in Tab. 1 aufgelistet.

eosinophile Effektorgruppen	eosinophile Produkte
basische Proteine	ECP, EDN, EPO, MBP
Chemokine	Eotaxin, MCP-1, MIP-1 α , RANTES
Zytokine	GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18, NGF, SCF, TGF- α , TGF- β , TNF- α
Lipidmediatoren	LTC ₄ , PAF, PGE ₁ , PGE ₂ , TXB ₂
Enzyme	Histaminase, Katalase
Neuropeptide	Substanz P, VIP
Ko-stimulierende Moleküle	CD 28, CD 40, CD 80 (B 7.1), CD 86 (B 7.2)
Antigen-Präsentation	MHC-class II

Tab. 1: Produkte der eosinophilen Granulozyten [6;7;15;21;22]

MCP-1: monocyte chemotactic protein-1, MIP-1 α : macrophage inflammatory protein-1 α , RANTES: regulated on activation, normal T cells expressed and secreted, GM-CSF: granulocyte macrophage colony stimulating factor, IFN- γ : Interferon- γ , IL: Interleukin, NGF: nerve growth factor, SCF: stem cell factor, TGF- α , - β : transforming growth factor- α , - β , TNF- α : tumor necrosis factor- α , LTC₄: cysteinyl-Leukotrien C₄, PAF: platelet activating factor, PGE₁, -E₂: Prostaglandin E₁, -E₂, TXB₂: Thromboxan B₂, VIP: vasoactive intestinal peptide, CD: cluster of differentiation, MHC class-II: major histocompatibility complex class-II.

Das eosinophilenspezifische Granulaprotein ECP wirkt antihelminthisch, zyto- und neurotoxisch. Zusätzlich ist eine Ribonukleaseaktivität nachweisbar. Dieses basische Protein kann auch die Freisetzung von Histamin aus basophilen Granulozyten oder Mastzellen induzieren. Die Aktivierung der Mastzellen tritt häufig bei allergischen Erkrankungen auf. Der ECP-Gehalt im Serum ist ein Aktivierungsmarker der allergischen Immunantwort [7;23;24]. Eosinophile stellen auch eine Quelle für cysteinyl-Leukotriene dar, die u.a. eine zentrale Rolle bei der allergischen Entzündungsreaktion haben. Das LTC₄ bedingt neben der Kontraktion der glatten Muskulatur auch die Erhöhung der Schleimsekretion und der Gefäßpermeabilität [7]. Die Wirkung einiger

Substanzen der eosinophilen Granulozyten auf die Entzündungsreaktion ist in Abb. 1 dargestellt. IL-4 beeinflusst die Differenzierung von Th(T-Helfer)2-Zellen. Die Produktion von Ig(Immunglobulin)E wird durch IL-4 und IL-13 angeregt. Außerdem bedingt IL-13 eine bronchiale Hyperaktivität. IL-5 und GM-CSF bewirken das „Priming“ (Prägung) der Zelle, d.h. die Zellen können nach Stimulation mit bestimmten Substanzen mehr Mediatoren freisetzen, wenn zuvor ein Priming dieser Zellen vorhanden war. Zusätzlich sind diese beiden Zytokine an der Apoptose und der Hämatopoese beteiligt. IL-8 wirkt vornehmlich chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten [25]. Eine Aktivierung der Mastzellen ruft das gebildete SCF (stem cell factor) hervor. Die angeborene Immunität, Adhäsion und Chemotaxis werden durch TNF- α reguliert [5;11]. Über die Produktion von TGF- α und - β sind Eosinophile u.a. auch an dem Gewebsumbau, der Geweberegeneration sowie der Immunregulation beteiligt [5;11;26].

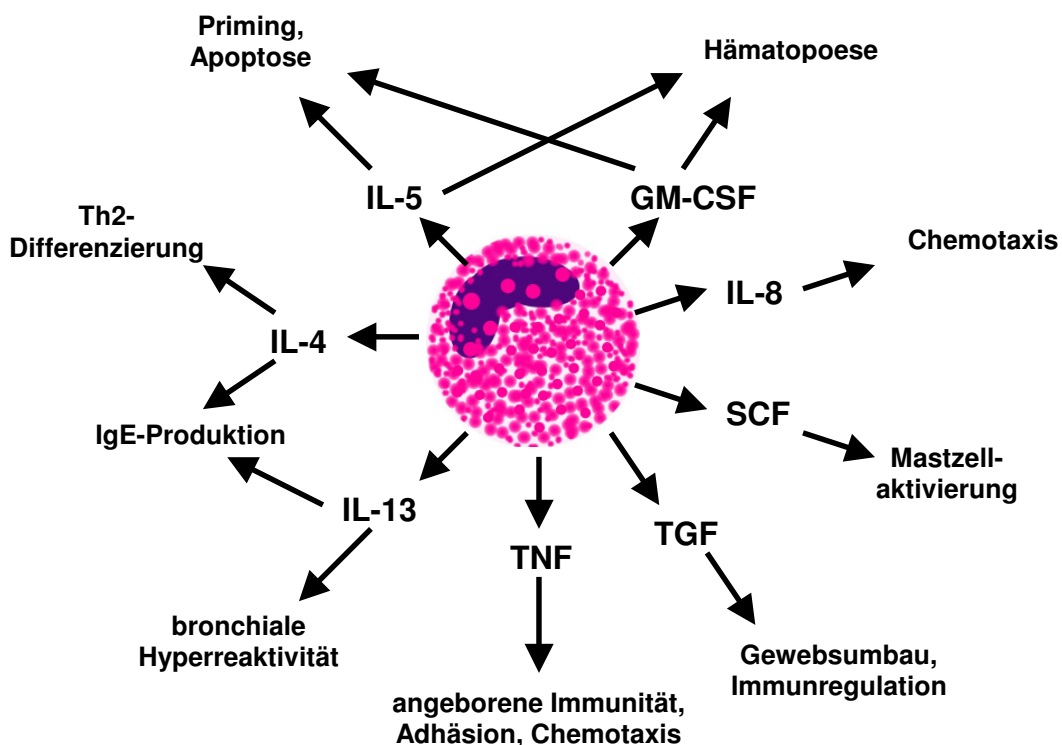


Abb. 1: Zytokine mittels derer eosinophile Granulozyten Entzündungsreaktionen modulieren
(Abbildung modifiziert nach Straumann und Simon [5])

1.2.3. Aktivierung der eosinophilen Granulozyten

Eosinophile exprimieren Rezeptoren für diverse Substanzen, die sie größtenteils auch selbst sezernieren. Die Aktivierung der eosinophilen Granulozyten ist bedingt durch die Bindung von Rezeptorliganden [7]. Eine entscheidende Folge der Aktivierung ist die Freisetzung der sekundären Granulaproteine sowie die Neusynthese der Substanzen [7;11;27-29]. Aktivierende Rezeptoren sind u.a. für IgA, IgG und IgE [13;30] sowie für verschiedene Zytokine (wie IL-3, IL-5, GM-CSF, IFN- γ , TGF- β oder TNF- α) vorhanden [11;13]. Weitere aktivierende Stimuli sind Allergene, Virusinfektionen oder Gewebeverletzungen [6]. Auch chemotaktische Agonisten wie RANTES, MIP-1 α , PAF, C5a oder fMLP (N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin) aktivieren Eosinophile [11;28;31-34]. Die Degranulation kann durch ein Priming mit den Zytokinen IL-3, IL-5 oder GM-CSF deutlich gesteigert werden [11;21;28;35]. Eine andere wichtige Funktion der Rezeptoren ist die Interaktion mit Substanzen, die chemotaktisch wirken [11;13;36].

1.2.4. Einwanderung von eosinophilen Granulozyten

Eosinophile Granulozyten haben die Fähigkeit, intakte Gefäße der Blutbahn verlassen zu können und sich amöboid zu bewegen [1;2;10]. Untersuchungen an Mäusen zeigen, dass sich die Einwanderung von Eosinophilen in den Gastrointestinaltrakt unabhängig von der Darmflora während der embryonalen Entwicklung vollzieht [7]. Eosinophile Granulozyten infiltrieren auch unter nicht-pathologischen Bedingungen in die Darmmukosa [37;38]. In der intestinalen Mukosa wird das Infiltrieren der Eosinophilen vornehmlich durch die Adhäsionsmoleküle $\alpha 4\beta 7$ und MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) vermittelt [7]. Eine schematische Darstellung der Migration von eosinophilen Granulozyten in den Gastrointestinaltrakt zeigt Abb. 2. Chemotaktische Substanzen binden an die entsprechenden Rezeptoren der Eosinophilen. Chemotaktisch wirken hauptsächlich die Chemokine RANTES, MIP-1 α sowie MCP-3 [11]. Auch Lipidmediatoren (Leukotriene, PAF) und Bakterienanaloga (fMLP) haben eine chemotaktische Wirkung. Eine Eosinophilen-selektive Chemotaxis weist das Chemokin Eotaxin (Eotaxin, Eotaxin-2 und Eotaxin-3) auf, das u.a. im ganzen gastrointestinalen Gewebe exprimiert wird [7;11;36]. Die Wirkung von Eotaxin wird durch IL-5 potenziert [39]. Chemotaktische

Substanzen werden durch Mastzellen, aktivierte Lymphozyten und Basophile produziert [7;10].

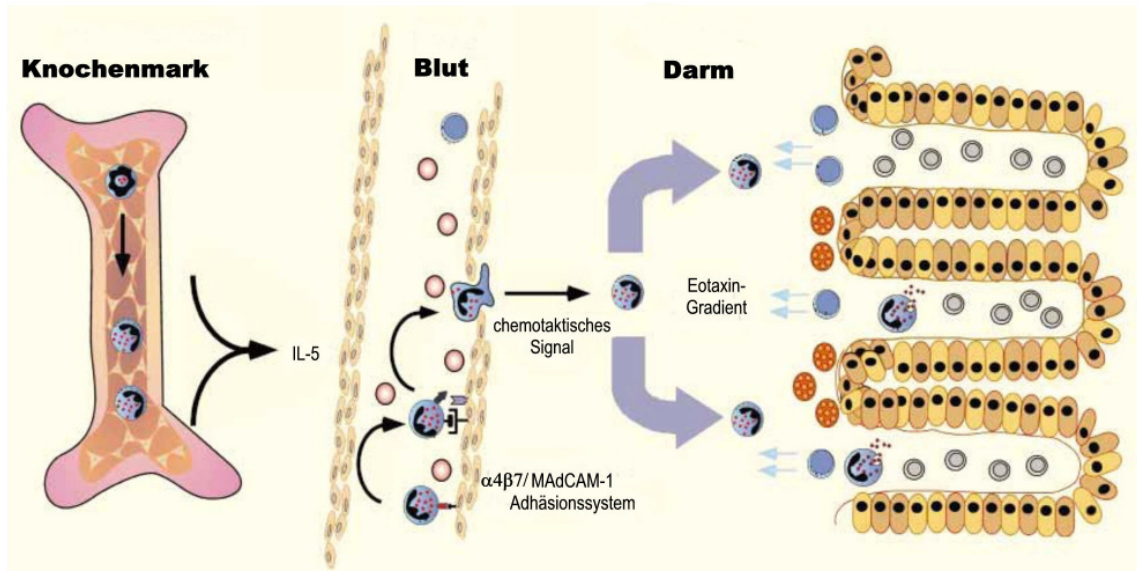


Abb. 2: Einwanderung der eosinophilen Granulozyten in den Darm

[Abbildung modifiziert nach Rothenberg et al [6]]

Eosinophile Granulozyten gehen aus dem Knochenmark ins Blut über. Dieser Vorgang wird vornehmlich durch IL-5 gesteuert. Die Eosinophilen „rollen“ am Endothel entlang. Bei der Verbindung des $\alpha 4\beta 7$ -Integrin der Eosinophilen mit dem MAdCAM-1-Rezeptor des intestinalen Endothels erfolgt die Adhäsion der Zellen. Entlang des chemotaktischen Eotaxingradienten gelangen die eosinophilen Granulozyten hauptsächlich in die Lamina propria. IL-5 verstärkt dabei die Chemotaxis. Im Darmgewebe können die Eosinophilen nach Aktivierung degranulieren.

1.2.5. Gastrointestinale eosinophile Granulozyten

Unter normalen Bedingungen liegen eosinophile Granulozyten in hämatopoetischen und lymphatischen Organen vor. Die Ausnahme bildet der Gastrointestinaltrakt. Dort sind auch unter nicht-pathologischen Bedingungen gewebständige eosinophile Granulozyten nachweisbar [5]. Diese Eosinophilen befinden sich vornehmlich in der Lamina propria. Eine geringe Anzahl ist auch in den interepithelialen Bereichen und in den Peyerschen Plaques vorhanden [7]. Die Dichte der gastrointestinalen Eosinophilen ist im zökalen und im Appendixareal am höchsten. Dagegen sind im nicht-entzündeten Ösophagus keine Gewebeeosinophilen nachweisbar [5]. Eine erkennbare Degranulation der Eosinophilen liegt nur in der Lamina propria des Gastrointestinaltrakts vor. Dabei sind eosinophile Granulozyten ein wichtiger Bestandteil

des gastrointestinalen Immunsystems [6]. Bestimmte Zytokine üben eine entscheidende Wirkung auf intestinale Eosinophile aus. Im Vordergrund steht das v.a. von Th2-Zellen produzierte IL-5. Dazu kommen IL-3 und GM-CSF, die von Th1- und Th2-Zellen sekretiert werden. Diese Zytokine, die das Wachstum, die Heranreifung und die Differenzierung der Eosinophilen beeinflussen, spielen auch bei der Einwanderung ins Gewebe eine wichtige Rolle. Im Gewebe verlängern diese Zytokine das Überleben der eosinophilen Granulozyten [40]. Die genaue Überlebensdauer ist aber unbekannt. In vitro lässt sich die Lebensspanne der Gewebseosinophilen durch die Zugabe der genannten Zytokine von weniger als 48 Stunden auf 12 bis 14 Tage verlängern [13;19]. Zusätzlich können diese Zytokine eosinophile Granulozyten aktivieren und die Wirkung von anderen Substanzen potenzieren [40]. Außerdem präsentieren Eosinophile Antigene und produzieren ko-stimulierende Substanzen. Eine Interaktion zwischen T-Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten ist wahrscheinlich [6]. Eosinophile Granulozyten sind an verschiedenen entzündlichen Prozessen beteiligt [5]. Eine Eosinophilie liegt bei verschiedenen Erkrankungen im Gewebe vor und kann sämtliche Bereiche und Gewebetiefen des Gastrointestinaltrakt betreffen. Die genaue Funktion ist bei manchen Krankheitsbildern aber noch unklar [6;7].

1.2.6. Gastrointestinale Entzündungsreaktionen

Die Eosinophilie ist ein Merkmal bei gastrointestinalen Krankheiten wie Nahrungsmittelallergie, eosinophiler Gastroenteritis, allergischer Colitis, entzündliche Darmkrankheit und gastroösophageale Refluxkrankheit. Eine Zusammenstellung der Eosinophilen-assoziierten gastrointestinalen Krankheitsbilder ist in Tab. 2 getroffen. Es liegt eine Korrelation der Schwere der Erkrankung mit dem eosinophilen Infiltrationsgrad vor [41]. Gastrointestinale Eosinophile scheinen regulatorische sowie effektorische Funktionen zu haben [7]. Jedoch wird die genaue Funktion der eosinophilen Granulozyten noch diskutiert. Den bisherigen Daten liegen größtenteils Studien zugrunde, welche die Rolle dieser Zellen bei allergischen respiratorischen Erkrankungen darstellt [6].

Die Th2-Zellen dominierten, gastrointestinalen Entzündungsreaktionen wie Nahrungsmittelallergie und z.T. chronisch-entzündliche Darmkrankheit, zeichnen sich u.a. durch die Expression von IL-4, IL-5 sowie IL-13 und die damit verbundene Akkumulation von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen aus. Ein zentraler

Bestandteil bei der Begrenzung und Verhinderung von Entzündungsprozessen könnte TGF- β 1 sein. Chronische Entzündungsprozesse, wie die chronisch entzündliche Darmkrankheit oder die Allergie, scheinen durch eine ungenügende Expression oder Funktion des TGF- β 1/TGF- β -Rezeptorsystems verbunden zu sein. Unklar sind die Regulation der TGF- β 1-Expression, die beteiligten Rezeptoren bzw. Signalwege sowie die Modulation von Funktionen der eosinophilen Blut- und Darmgranulozyten [42;43].

Überbegriffe	einzelne Krankheiten
primäre (idiopathische) eosinophile Erkrankungen	<ul style="list-style-type: none"> - primäre eosinophile Ösophagitis - primäre eosinophile Gastroenteritis - Hypereosinophilie-Syndrom mit gastrointestinaler Beteiligung
parasitäre Infektionen	<ul style="list-style-type: none"> - Infektions-assoziierte Eosinophilie - Infektions-induzierte Eosinophilie
Entzündungs-assoziierte Eosinophilie	<ul style="list-style-type: none"> - gastroösophageale Refluxkrankheit - Zöliakie - Morbus Crohn - Colitis ulcerosa
Andere	<ul style="list-style-type: none"> - Hypersensitivitäts-assoziierte Eosinophilie - Eosinophilie-assoziierte Neoplasien - Eosinophilie-assoziierte Erkrankungen des Bindegewebes

Tab. 2: Klassifikation von eosinophilen Granulozyten-assoziierten Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts

[Tabelle modifiziert nach Straumann und Simon [5]]

1.3. Transforming growth factor β (TGF- β)

1.3.1. Allgemeines und Funktion von TGF- β

Im Jahre 1978 wurde ein Wachstumsfaktor für Mesenchymzellen in speziellen Mausfibroblasten, der sarcoma growth factor, zum ersten Mal beschrieben. Dieser Faktor konnte in vitro die neoplastische Transformation auf untransformierte Fibroblasten übertragen. Diese Fähigkeit gab der Substanz den heute noch gebräuchlichen Namen transforming growth factor(TGF)- β [44;45]. Es sind die 3 Isoformen TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 in den Säugetieren bekannt [45-47]. In Studien an Mäusen konnte gezeigt werden, dass ohne die Isoformen TGF- β 1 und TGF- β -3 kein Über-

leben möglich ist [48]. TGF- β ist ein Zytokin mit multifunktionellen und pleiotropen Eigenschaften [48] und gehört zu einer Superfamilie von speziellen Molekülen. Diese Moleküle beeinflussen Wachstum, Differenzierung und Entwicklung vieler Zellen [46]. Als zwei der Hauptfunktionen von TGF- β sind die Hemmung des Zellwachstums und der Zellproliferation sowie die Suppression immunmodulatorischer Zellen genannt. Jedoch regt dieses Zytokin bei bestimmten Mesenchymzellen das Wachstum an. Die dritte Hauptfunktion ist die Induktion von Proteinen der extrazellulären Matrix, wodurch u.a. die Wundheilung beeinflusst wird. Neben der Beendigung einer Immunantwort, kann TGF- β diese auch induzieren. So wirkt es z.B. chemotaktisch auf Entzündungszellen und Fibroblasten und kann eine Umkehrung der Wirkung anderer Zytokine hervorrufen. TGF- β wird auch eine Funktion bei der Angiogenese zugeschrieben [26;47]. Jede Zelle mit leukozytischer Abstammungslinie kann TGF- β exprimieren [26]. Hauptsächlich wird dieses Zytokin von T-Zellen, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Monozyten synthetisiert. Auch Megakaryozyten und Fibroblasten bilden TGF- β [49]. Die Rezeptoren und Liganden für TGF- β werden in praktisch jedem Körpergewebe exprimiert [45;48;50]. Aufgrund der vielfältigen Eigenschaften kann eine Fehlfunktion von TGF- β pathologische Folgen haben. Diese Fehlfunktion kann durch ungenügende Aktivierung oder zu geringe bzw. hohe Bildung der Isoformen bedingt sein. Eine Folge des Fehlens von TGF- β -Rezeptoren ist der Verlust der Wachstumshemmung bei der Karzinogenese bestimmter Tumoren [46]. Eine gesteigerte Produktion und Aktivierung von latentem TGF- β wurde mit Immundefekten bei malignen und autoimmunen Erkrankungen, mit der Anfälligkeit für opportunistische Infektionen und mit fibrotischen Komplikationen bei chronischen Entzündungen in Verbindung gebracht. Zusätzlich ist TGF- β ein Hauptmediator der oralen Toleranz [45;48;50;51].

1.3.2. Aktivierung von TGF- β

TGF- β wird in der inaktiven Form (=latente Form) als Homodimer von den meisten humanen Zellen freigesetzt. In vivo ist innerhalb von 90 min die Hälfte des rekombinanten latenten TGF- β abgebaut. Eine Regulation der TGF- β -Wirkung erfolgt über die Aktivierung des Moleküls. Die TGF- β -Isoformen werden in vitro durch ein saures Milieu (pH ~ 3) aktiviert. Weitere Mechanismen und Faktoren kommen in vivo hinzu,

wie Thrombospondin und Plasmin [46]. Aktiviertes TGF- β liegt als Homo- oder Heterodimer mit einem Molekulargewicht von 25 kD vor und wird innerhalb weniger Minuten hepatisch aus der Blutzirkulation eliminiert [45;46;50].

1.3.3. Die Isoform TGF- β 1

Die Isoform TGF- β 1 gilt als Musterbeispiel für die Eigenschaften der Superfamilie [46]. TGF- β 1 hat eine proliferative Wirkung auf T-Zellen. Es steuert die Ansammlung und Aktivierung von Leukozyten durch vermehrte Bildung von Adhäsionsmolekülen, Generierung von chemotaktischen Gradienten und Induzierung von proinflammatorischen Zytokinen, inklusive TGF- β 1 selbst. Es wirkt chemotaktisch auf Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, neutrophile Granulozyten und Mastzellen. Außerdem wird TGF- β 1 eine endokrine Funktion zugeschrieben [46]. Manche Modelle zeigen auch eine Aktivierung von B-Lymphozyten infolge von TGF- β 1-Stimulation. Weiterhin hat es die unter 1.3.1. genannten Eigenschaften wie die Entzündungshemmung und Gewebsregeneration [50]. In Tab. 3 sind die antiinflammatorischen Wirkungen von TGF- β 1 zusammengefasst. Im Gastrointestinaltrakt scheint eine der TGF- β 1-Funktionen die Regulation der Epithelbildung zu sein. Über die genaue Rolle von intestinalem TGF- β 1 ist jedoch wenig bekannt [47].

- Hemmung und Verkürzung der Lebensdauer von Entzündungszellen
- Reduktion der Freisetzung von Zytokinen, Sauerstoffradikalen und Lipidmediatoren
- Erhöhung der IgA-Synthese
- Förderung der Differenzierung von Th3-Lymphozyten* → Potenzierung der Wirkung von TGF- β 1
- Induktion von Proteinen der extrazellulären Matrix in Fibroblasten
- Regulation der Epithelien

*synthetisieren definitionsgemäß TGF- β 1

Tab. 3: Antiinflammatorische Eigenschaften von TGF- β 1 [26;46;47;52-54]

1.3.4. TGF- β 1 und eosinophile Granulozyten im Gastrointestinaltrakt

Antiinflammatorische Zytokine wie TGF- β 1 könnten ausschlaggebend dazu beitragen, dass Entzündungsreaktionen unterbrochen werden bzw. ein Überschießen der Reaktion verhindert wird. So wirkt es chemotaktisch und v.a. hemmend auf Differenzierung, Proliferation und Funktion der eosinophilen Granulozyten [55]. Intestinale Eosinophile beeinflussen die proinflammatorischen Vorgänge, Entzündungen, Wundheilung sowie die Immunabwehr [7]. Bis jetzt ist nur wenig über das gastrointestinale Vorkommen von TGF- β 1 bekannt. Während einer Entzündung im Darm steigt die TGF- β 1-Expression in ortständigen Gewebezellen und aktivierten, eingewanderten Entzündungszellen an [26;56]. Es fehlen aber weitere Informationen über gastrointestinale Zellen, die TGF- β 1 produzieren.

In unserer Arbeitsgruppe konnten immunhistochemisch 90% der TGF- β 1-positiven Darmzellen als eosinophile Granulozyten identifiziert werden. Dies traf sowohl im pathologischen als auch im nicht-pathologischem Gewebe zu. Bei Patienten mit intestinaler Eosinophilie waren in der Lamina propria mehr TGF- β 1-positive Zellen nachweisbar als bei Gesunden. Es färbten sich weitere Zellen der Lamina propria (T-Zellen, Fibroblasten oder Epithelzellen) nur schwach an. Eosinophile Granulozyten scheinen also eine wichtige Quelle für TGF- β 1 im Darmtrakt zu sein [57]. Kurz darauf wurde von einer anderen Arbeitsgruppe ein ähnliches Ergebnis veröffentlicht [58]. In der Lunge bei asthmatischen Patienten [59] sowie beim nodulär-sklerosierenden Hodgkin-Lymphom [60] sind eosinophile Granulozyten eine hauptsächliche TGF- β 1-Quelle. Die eosinophile TGF- β 1-Produktion könnte bei der Karzinogenese, den entzündlichen Fehlfunktionen und der Wundheilung eine Rolle spielen. Daher könnte die Untersuchung der bisher wenig bekannten Mechanismen der eosinophilen Aktivierung und TGF- β 1-Produktion von großem therapeutischen Nutzen sein [40].

1.4. Zielsetzung

Zu Beginn dieser Arbeit war nur wenig über die Eigenschaften und Funktionen der gastrointestinalen Eosinophilen bekannt. Es fehlen auch Informationen, inwieweit eosinophile Granulozyten im Gewebe andere Substanzen als Eosinophile aus Blut synthetisieren und freisetzen [7]. Ein Grund dafür war, dass sich bisher die Forschung (in vivo) hauptsächlich auf die Mechanismen und Funktionen der Eosinophilen in Lunge und Blut konzentriert hatte. [6]. Es fehlen auch Untersuchungen über TGF- β 1-produzierende Zellen des Gastrointestinaltrakts. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass eosinophile Granulozyten den größten Anteil der immunhistochemisch TGF- β 1-positiven Zellen im Darm ausmachen [57;58]. Inwieweit in diesen Zellen die TGF- β 1-Expression induziert wird oder ob TGF- β 1-Reservoirs in intestinalen eosinophilen Granulozyten existieren, die nach Stimulation entleert werden, war dagegen nicht klar.

Ziel dieser Arbeit ist es die eosinophilen Granulozyten aus peripherem venösen Blut und Darmmukosa zu vergleichen. Dazu müssen diese Zellen zunächst mit einer geeigneten Methode aus Blut isoliert und angereichert werden. Weiterhin soll eine Methode zur Isolation und Anreicherung von eosinophilen Granulozyten aus intestinaler Mukosa etabliert werden. Insbesondere soll die Mediatorfreisetzung von ECP, LTC₄ und TGF- β 1 in Stimulationsexperimenten (in vitro) untersucht werden. Zusätzlich soll eine Analyse der Expression von TGF- β -mRNA in der RT- und Realtime-PCR durchgeführt werden. Schließlich soll ein Vergleich der Eosinophilen aus Blut, über die schon viel bekannt ist, mit denen aus intestinaler Mukosa mittels RT-PCR erfolgen. Insbesondere das Expressionsmuster antiinflammatorischer Zytokine und spezifischer Chemokine soll zu diesem Zweck analysiert werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Reagenzien und Puffer

Materialien für die Zellaufarbeitung: Acetylcystein (Sigma-Aldrich, München); Ampicillin (Ratiopharm, Ulm); BSA (bovines Serumalbumin, Fraktion IV, fettsäurefrei, Boehringer, Mannheim); Collagenase D (Roche, Mannheim); Chymopapain (Sigma-Aldrich, München); CaCl₂ (Merck, Darmstadt); DNase I (Boehringer, Mannheim); Dextran 70 (Amersham Biosciences, Schweden); Elastase (Boehringer, Mannheim); EDTA (Sigma-Aldrich, München); Ficoll-Lösung (Ficoll-Paque™ PLUS, Amersham Biosciences, Schweden); Ficoll-Röhrchen (Falcon 3033, Kulturgewebsröhrchen, Becton Dickinson, USA); Gelatine (Sigma-Aldrich, München); HEPES (4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazine-N-2-ethanesulfonic acid, Sigma-Aldrich, München); Pronase (Boehringer, Mannheim); 30 µm, 100 µm sowie 250 µm Nybold-Filter (Gaze, Omnilab, Bremen); MACS-System (magnetic beads-activated cell sorting) mit MACS LS Säulen (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach), Metronidazol (Baxter, Unterschleißheim), MgCl₂ (Sigma-Aldrich, München); NaCl (Merck, Darmstadt); Percoll (Sigma-Aldrich, München); Trypanblau (Sigma-Aldrich, München), Zählkammer Neubauer (Assistent [Karl Hecht KG], Sondheim)

Substanzen für die Zellkultur: Amphotericin B (Gibco Life Technologies, Großbritannien); FCS (fetal calf serum, Gibco Life Technologies, Großbritannien); Gentamycin (Gibco Life Technologies, Großbritannien); Penicillin/Streptomycin (Gibco Life Technologies, Großbritannien); RPMI 1640 (Gibco Life Technologies, Großbritannien); 75 und 175 cm² Zellkulturflaschen (NUNC, Wiesbaden); Kulturplatten mit 6-, 12-, 24-, 96-wells (NUNC, Wiesbaden); Kulturmedium: RPMI 1640 (mit 25 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin) ohne Phenolrot, 10% bzw. ohne FCS, 100 µg/ml Gentamycin und Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 0,5 µg/ml Amphotericin

Lösungen und Puffer: Sämtliche Lösungen und Puffer wurden mit sterilem, pyrogenfreiem Wasser („Aqua Spüllösung“, Delta Select GmbH, Dreieich) angesetzt und nach steriler Filtration bei 4°C aufbewahrt. Acetylcystein-Lösung (20 µg Acetylcystein in 50 ml Tyrode(1 x)-EDTA-Puffer); CE-Lösung (1,5 mg/ml Collagenase D in

TGMD-Puffer); Dextran-Lösung (6%iges Dextran 70 in 0,9%iger NaCl-Lösung); 0,5 M EDTA (Ethylendiamintetraacetat, Sigma-Aldrich, München); HA-Puffer (HEPES-Puffer mit 2,5 mg/ml BSA); HACM-Puffer (100 mM CaCl₂ und 100 mM MgCl₂ in HA-Puffer); HA-EDTA-Puffer (10 mg/ml BSA, 2 mM EDTA in HEPES-Puffer); HEPES-Puffer (20 mM HEPES, 5 mM NaCl, 0,5 mM D-Glucose, 5 mM KCL); 3,6%ige NaCl-Lösung; 10 x PBS-Puffer (phosphate-buffered saline, Gibco Life Technologies, Großbritannien); PCh-Lösung (3 mg/ml Pronase, 0,75 mg/ml Chymopapain in TE-Puffer); Percoll-Gradient mit einer Dichte von 1,09 (isotone Percoll-Lösung: 22,5 ml Percoll-Stock-Lösung, 2,5 ml 10 x HEPES-Puffer; Percoll-Gradient: 17,95 ml isotone Percoll-Lösung, 7,05 ml 1 x HEPES-Puffer); TE-Puffer (2 mM EDTA in Tyrode-Puffer); TEA-Puffer (0,2% Ampicillin, 0,4% Gentamycin, 4% Metronidazol in TE-Puffer); TGMD-Puffer (1,23 mM MgCl₂, 0,015 mg/ml DNase, 5% Gelatine (2%ige Gelatine in 10 x Tyrode-Puffer) Tyrode-Puffer (5,55 mM D-Glucose, 0,36 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl)

Materialien und Substanzen für Westernblot: 30%ige Acrylamidlösung mit 0,8% Bisacrylamid (Rotiphorese[®] Gel 30, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe); 10%iges Ammoniumperoxidsulfat (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe); Blotkammer (Mini Blot Kammer, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA); Magermilchpulver (Merck, Darmstadt); Low Range Marker (BioRad Laboratories, München); Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell, Einbeck); PBS-Tween (PBS + 0,25% Tween, Sigma-Aldrich, München); Protease Inhibitor Cocktail Complete[™] Mini (Roche Diagnostics, Germany); Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce, Rockford, USA); Hyperfilm[™] MP (Amersham Pharmacia Biotech, UK); TEMED (Pharmacia Biotech, UK); TGF-β1 (PeproTech, USA); Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethan, Merck, Darmstadt); Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer Life Sciences, USA)

Puffer für Westernblot: Extraktionspuffer (25 mM Tris-HCl; 0,5 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 0,05% 100 x Triton; 100 mM β-Mercaptoethanol; 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Aprotinin; für den Gebrauch: 0,5 ml 100 mM PMSF in 100% Ethanol auf 100 ml Extraktionspuffer, pH 7,4); 4 x Trenngelpuffer (18,18 g Tris + 4 ml SDS 10%ig, mit HCl auf pH 8,8 einstellen und mit H₂O auf 100 ml auffüllen); 4 x Sammelgelpuffer (18,18 g Tris + 12 ml 10%iges SDS, mit HCl auf pH 8,8 einstellen und mit H₂O auf 100 ml auffüllen); Acrylamidlösung (30%ige Acrylamidlösung mit 0,8% Bisacrylamid); 10 x Laufpuffer (30 g Tris + 144 g Glycin + 100 ml SDS 10%ig mit H₂O auf 1 l auffül-

len); Trenngel (2,5 ml Trenngelpuffer + 4 ml Acrylamidlösung + 3,4 ml H₂O + 100 µl 10%iges Ammoniumperoxidsulfat [0,1 g in 1 ml H₂O] + 10 µl TEMED); Sammelgel (0,75 ml Sammelgelpuffer + 0,45 ml Acrylamidlösung + 1,8 ml H₂O + 30 µl 10%iges Ammoniumperoxidsulfat + 3 µl TEMED); 10 x SDS-Page-Puffer (151,4 g Tris, 720 g Glycin; 50 g SDS; mit H₂O auf 1 l auffüllen, pH 8,8); PBS-Tween (PBS + 0,25% Tween); Westernblot-Puffer (2,9 g Glycin; 5,8 g Tris; 0,37 g SDS; 200 ml Methanol, mit H₂O auf 100 ml auffüllen, pH 8,3); Probenpuffer (0,2 mg/ml Glycerin, 20 ml 10%iges SDS, 25 ml SGP, 20 ml DTT (1 mol), 0,5 mg Bromphenolblau, mit H₂O auf 100 ml auffüllen, pH 8,8)

Antikörper: antihumane CD15- und CD16-Mircobeads für MACS-System (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach), mouse antihuman TGF-β (1 mg/ml; monoklonaler Antikörper, Chemicon International, CA), ECL antimouse IgG (peroxidase-linked species-specific whole antibody from sheep, monoklonaler Sekundärantikörper, Amersham Biosciences, UK)

Zytokine und Stimulanzien: Cytochalasin B (Sigma-Aldrich, München); fMLP (Sigma-Aldrich, München); IL-3 human (Pepro Tech [tebu-bio]); IL-5 human (Pepro Tech [tebu-bio]); Calcium Ionophor A 23187 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

Färbelösungen: Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblau, Riedel-deHaen, Seelze); May-Grünwald-Lösung (Merck, Darmstadt); Trypanblau (Sigma-Aldrich, München); DiffQuick (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg)

2.1.2. Mediatormessung

Gerät: „UniCAP 100“, Reagenzien „UniCAP ECP-Fluoroenzymeimmunoassay, -Calibrators und -Control“ (Pharmacia Diagnostics, Schweden); human TGFβ-1 Immunoassay (Quantikine, R&D Systems GmbH, Wiesbaden); cysteinyl-Leukotriene ELISA (Biotrend, Assay Designs Inc., USA); Messung der Absorption jeweils mit dem Gerät: „Lambda Scan 200e“ (MWG-Biotech AG, USA)

2.1.3. Ribonukleinsäure(RNA)-Untersuchung

RNA-Isolation aus isolierten Zellen: RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden); RNase freie DNase (Promega, USA); dNTP (Promega, USA); Oligo dT Primer (Pharmacia, Schweden); Superscript III™ Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe)

Polymerasekettenreaktion (RT-PCR): Platinum Taq DNA-Polymerase (5 Units/μl, Invitrogen, Karlsruhe); Primer (synthetisiert bei MWG Biotech AG, Ebersberg); dNTP (Promega, USA); 100 bp DNA-Ladder (Invitrogen, Karlsruhe)

Realtime-PCR: Optical Tubes und Caps (Applied Biosystems, UK); SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems, UK)

2.2. Methoden

2.2.1. Isolation von humanen eosinophilen Granulozyten aus peripherem Blut (mit und ohne Percoll-Dichtegradient)

Die Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover genehmigte die Untersuchung und Forschung an menschlichem Blut (Nr. 3109 vom 17.12.2002). Ausgangsmaterial für die Isolation war venöses Blut von freiwilligen, gesunden Spendern aus der Arbeitsgruppe Bischoff sowie aus meinem näheren Bekanntenkreis. Zusammengefasst besteht die Isolation der peripheren eosinophilen Granulozyten aus der Sedimentation des Blutes, der Dichtezentrifugation durch den Ficoll-Gradienten, der Lyse der Erythrozyten und anschließender Percoll-Dichtezentrifugation [31;34].

1. Entnahme von 90 – 120 ml Blut aus einer Vene und Verteilung von 30 ml Blut auf je ein mit 7,5 ml 6%iger Dextran-Lösung und 3 ml 0,1 M EDTA gefüllten Falcon
2. Schwenken der Falcons und Blutsedimentation für 60 – 90 min bei Raumtemperatur (mindestens $\frac{1}{3}$ Überstand sollen sich gebildet haben)
3. Zentrifugation der Überstände (800 U/min, 20 min, 20°C)
4. Resuspension der Zellpellets in HA-Puffer und poolen der Pellets
5. Aufnahme der Zellsuspension in 40 ml HA-Puffer (Zellzählung mit der Trypanblau-Methode und Neubauer-Zählkammer sowie -Differenzierung mit DiffQuick

gefärbten Zytospins) und Verteilung von jeweils 5 ml auf mit 5 ml Ficoll-Lösung gefüllte Röhrchen

6. Zentrifugation (1500 U/min, 30 min, 20 °C, ohne Bremse)
7. Resuspension der Zellpellets in Ficoll-Lösung und poolen der Pellets
8. Aufnahme in 50 ml HA-Puffer (Zellzählung und Differenzierung s.o.) und Zentrifugation (1200 U/min, 10 min, 4 °C)
9. Resuspension des Zellpellets in 5 ml HA-Puffer
10. Erythrozytenlyse: Mischung der Suspension nach Zugabe von 24 ml eiskalter Aqua Spüllösung und nach 25 sec Zugabe von 3,6%ige NaCl-Lösung
11. Pellet in 1 ml HA-Puffer resuspendieren und in 16 ml HA-Puffer aufnehmen sowie Verteilung von jeweils 2 ml auf mit 3 ml Percoll-Gradientenlösung gefüllte Röhrchen
12. Zentrifugation (1500 U/min, 30 min, 4 °C, ohne Bremse)
13. Aufnahme in 50 ml HA-Puffer (Zellzählung und Differenzierung s.o.) und Zentrifugation (1200 U/min, 10 min, 4 °C)
14. Auffüllung mit HA-Puffer auf 50 ml (Zellzählung und Differenzierung s.o.) und Zentrifugation (1200 U/min, 10 min, 4 °C)
15. Wiederholung des 11. Schritts

Zusammengefasst besteht die Isolation der peripheren eosinophilen Granulozyten ohne den Percoll-Dichtegradienten aus der Sedimentation des Blutes, der Dichtezentrifugation durch den Ficoll-Gradienten und der Lyse der Erythrozyten [40;49].

1. Entnahme von 90 – 120 ml Blut aus einer Vene und Verteilung von 30 ml Blut auf je ein mit 7,5 ml 6%iger Dextran-Lösung und 3 ml 0,1 M EDTA gefüllten Falcon
2. Schwenken der Falcons und Blutsedimentation für 60 – 90 min bei Raumtemperatur (mindestens $\frac{1}{3}$ Überstand sollen sich gebildet haben)
3. Zentrifugation der Überstände (800 U/min, 20 min, 20 °C)
4. Resuspension der Zellpellets in HA-Puffer und poolen der Pellets
5. Aufnahme der Zellsuspension in 40 ml HA-Puffer (Zellzählung und Differenzierung s.o.) und Verteilung von jeweils 5 ml auf mit 5 ml Ficoll-Lösung gefüllte Röhrchen
6. Zentrifugation (1500 U/min, 30 min, 20 °C, ohne Bremse)
7. Resuspension der Zellpellets in Ficoll-Lösung und poolen der Pellets

8. Aufnahme in 50 ml HA-Puffer (Zellzählung und Differenzierung s.o.) und Zentrifugation (1200 U/min, 10 min, 4°C)
9. Resuspension des Zellpellets in 5 ml HA-Puffer
10. Erythrozytenlyse: Mischung der Suspension nach Zugabe von 24 ml eiskalter Aqua Spüllösung und nach 25 sec Zugabe von 3,6%ige NaCl-Lösung
11. Aufnahme in 50 ml HA-Puffer (Zellzählung und Differenzierung s.o.) und Zentrifugation (1200 U/min, 10 min, 4°C)
12. Auffüllung mit HA-Puffer auf 50 ml (Zellzählung und Differenzierung siehe oben) und Zentrifugation (1200 U/min, 10 min, 4°C)
13. Wiederholung des 11. Schritts

2.2.2. Anreicherung von eosinophilen Granulozyten aus peripherem venösen Blut durch magnetische Zellseparation

Im allgemeinen beruht die magnetische Zellseparation auf der Expression zelltypspezifischer Oberflächenantigene. Diese Antigene werden mit spezifischen (Primär-) Antikörpern detektiert. Die Markierung erfolgt durch die Kopplung paramagnetischer Partikel (Microbeads) an den Primärantikörper bzw. ggf. an den Sekundärantikörper (Anti-Isotyp-Antikörper), der wiederum an den primären Antikörper bindet. Durchläuft nun die Suspension mit den gekoppelten Zellen eine magnetische Säule, so binden die gekoppelten Zellen an die Säulenmatrix (Positivfraktion). Zur Negativfraktion werden die Zellen gezählt, die aufgrund der fehlenden Expression des Oberflächenantigens nicht magnetisch markiert worden sind und somit die Säule ohne Bindung durchlaufen. Nach Entfernung der Säule aus dem magnetischen Feld können die gebundenen Zellen eluiert werden. Abhängig davon, ob die Zellen Negativ- oder Positivfraktion benötigt werden, handelt es sich um eine Negativ- oder Positivselektion. Unter Verwendung der Negativselektion mit anti-humanen CD16-Microbeads wurden eosinophile Granulozyten aus Blut aufgereinigt [31;49;61]:

1. Resuspension des Zellpellets in HA-EDTA-Puffer (100 µl/100* 10⁶ Gesamtzellen) und Zugabe von antihuman CD16-Microbeads (100 ml/100* 10⁶ Gesamtzellen)
2. Inkubation unter leichtem Schütteln (30 min, 4°C)

3. Zugabe von 1 – 2 ml HA-EDTA pro $10^* 10^6$ Zellen und anschließende Zentrifugation (300 g, 10 min, 4°C)
4. Resuspension des Zellpellets in 0,5 ml pro $100* 10^6$ Gesamtzellen sowie Pipettieren der Suspension auf die mit HA-EDTA-Puffer vorgespülte MACS-Säule
5. Nachspülung mit $3* 3$ ml HA-EDTA-Puffer
6. Zellzählung und Differenzierung (s.o.) der durchgelaufenen Fraktion sowie Zentrifugation (1200 U/min, 10 min, 4°C)
7. Aufnahme der Negativfraktion mit 70 – 100% Eosinophile in HACM-Puffer für das Sofortexperiment

2.2.3. Isolation von humanen eosinophilen Granulozyten aus intestinaler Mukosa

Die Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover genehmigte die Untersuchung und Forschung an menschlichem Darmgewebe (Nr. 3109 vom 17.12.2002). Als Ausgangsmaterial dienten chirurgische Dünn- und Dickdarmresektate, die hauptsächlich bei Tumoroperationen, aber auch bei Pankreaserkrankungen, chronisch entzündlicher Darmerkrankungen oder Divertikulose usw. entnommen werden mussten. Nach Entnahme wurden aus dem Resektat Gewebeproben ($10 - 50 \text{ cm}^2$) aus makroskopisch unauffälligen sowie tumorfreien Bereichen entnommen und in TEA-Puffer bei 4°C über Nacht gelagert. Die Isolation der Zellen aus dem Präparat erfolgte unter einer Laminar-Werkbank nach folgendem Protokoll:

1. Präparation der Tunica mucosa und Tela submucosa mit einer Schere und Auswiegen des präparierten Anteils
2. Schleimentfernung aus dem Gewebe durch die Inkubation in 50 ml Acetylcystein-Lösung für 10 – 20 min und Ablösung der Epithelzellen durch 20-minütige Inkubation in 40 ml Tyrode-Puffer mit 7 mM EDTA jeweils im 37°C warmen Schüttelwasserbad
3. Mechanische Zerkleinerung des Gewebes in einer mit 20 ml PCh-Lösung gefüllten Petrischale mit Hilfe einer Schere bis eine Suspension von ca. 1 mm^2 großen Gewebestückchen entsteht und Filtration der Suspension durch einen Nybold-Filter (250 μm) unter Spülung mit 50 ml TE-Puffer

4. Inkubation der Suspension in 30 ml PCh-Lösung für 30 min im 37°C warmen Schüttelwasserbad
5. Filtration durch einen 250 µm Nybold-Filter unter Spülung mit 50 ml TGMD-Puffer und Aufnahme der Gewebesuspension in 25 ml Collagenase-Lösung zur 30-minütigen Inkubation im 37°C warmen Schüttelwasserbad
6. Filtration durch einen 250 µm Nybold-Filter unter Spülung mit 75 ml TGMD-Puffer, Zentrifugation des Filtrates (1200 U/min, 10 min, 20°C) sowie Aufnahme des Zellpellets in Kulturmedium
7. Wiederholung der Inkubation mit Collagenase-Lösung und des 7. Schritts mit dem verbleibendem Gewebe im Filter
8. Vereinigung beider Einzelzellsuspensionen und Filtration durch einen Nybold-Filter (100 µm) unter Spülung mit 50 ml Kulturmedium
9. Zentrifugation des Filtrates (1200 U/min, 10 min, 20°C) und nachfolgende Aufnahme des Pellets in 20 ml Kulturmedium mit Zellzählung (Trypanblau-Methode und Neubauer-Zählkammer) und -Differenzierung (DiffQuick-gefärbte Zytospins)

Die Darmzellsuspension wurde mit einer Konzentration von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Kulturmedium (mit 10% bzw. ohne FCS) unter Zusatz von 10 ng/ml IL-5 bei 37°C über Nacht ausgesät. Im nächsten Schritt erfolgte die Aufreinigung der eosinophilen Granulozyten mittels magnetischer Zellseparation.

2.2.4. Anreicherung von humanen eosinophilen Granulozyten aus intestinaler Mukosa durch magnetische Zellseparation

Unter Verwendung der Positivselektion mit antihumanen CD15-Microbeads wurden eosinophile Granulozyten aus der Darmzellsuspension aufgereinigt:

1. Resuspension des Zellpellets in HA-EDTA-Puffer (100 µl/100 * 10^6 Gesamtzellen)
2. Zugabe von antihuman CD15-Microbeads (100 ml/100 * 10^6 Gesamtzellen)
3. Inkubation unter leichtem Schütteln (30 min, 4°C)
4. Zugabe von 1 – 2 ml HA-EDTA pro 10^6 Zellen und folgende Zentrifugation (300 g, 10 min, 4°C)
5. Resuspension des Zellpellets in 0,5 ml pro 100 * 10^6 Gesamtzellen

6. Pipettieren der Suspension auf die mit HA-EDTA-Puffer vorgespülte MACS-Säule sowie Nachspülung mit 3* 3 ml HA-EDTA-Puffer
7. Zellzählung und Differenzierung (s.o.) der durchgelaufenen Fraktion sowie Zentrifugation (1200 U/min, 10 min, 4°C)
8. Aufnahme der Positivfraktion mit 65 – 91% Eosinophile in HACM-Puffer für das Sofortexperiment

2.2.5. Aufbau der Stimulationsexperimente

Die aufgereinigten eosinophilen Granulozyten aus venösem Blut und Darmmukosa wurden in 0,25 – 1 ml HACM-Puffer mit $0,3 - 1 \cdot 10^6$ Zellen/ml pro Bedingung aufgenommen. Bei 37°C im Schüttelwasserbad erfolgte ein Priming für 10 min mit Cytochalasin B (5 µg/ml) und für weitere 90 min mit IL-5 (10 ng/ml). Die Eosinophilen wurden für 30 min mit Ionophor (1 µM) oder fMLP (1 µg/ml) stimuliert. Schließlich beendete die Kühlung auf Eis die Zellaktivierung. Es erfolgte nach dem Zentrifugieren (3000 U/min, 5-10 min, 20°C) eine Aliquotierung der Überstände (→ Analyse der Freisetzung von ECP-, LTC₄- und TGF-β1) und eine Lyse des Zellpellets in RLT-Puffer (→ Messung der mRNA-Expression), in Zellextraktionspuffer (→ Bestimmung der Proteinmenge im Westernblot) oder in Wasser (→ TGF-β1-Messung im ELISA). Zur Bestimmung der gesamten ECP-Menge in den Eosinophilen wurden vor jeder Stimulation Zellen abgenommen, zentrifugiert und das Zellpellet in Wasser lysiert. Sämtliche Proben wurden bei -80°C bis zur weiteren Untersuchung gelagert. Bei jedem Experiment lief eine Kontrollbedingung ohne Substanzzusatz mit, um die unstimulierte (basale) Mediatorfreisetzung bestimmen zu können. Zur Darstellung der ECP-Messergebnisse wurde der relativ freigesetzte Anteil in Bezug auf die insgesamt in den Zellen enthaltene ECP-Menge angegeben. Die gemessenen Werte der anderen Mediatoren sind jeweils als absolute Freisetzung aufgeführt.

2.2.6. Zellzählung und Differenzierung

Nach der Färbung von 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau wurden die Zellen in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Dabei wurden mindestens 100 lebende Zellen gezählt, die keine Farbe aufnahmen und hell leuchteten. Dagegen färbten sich tote Zellen blau und erschienen dunkel. Da ein Zählquadrat der Kammer einem

Volumen von 0,05 µl entspricht, kann durch Multiplikation mit dem Faktor 20.000 die Konzentration der Zellen (Anzahl/ml) auf dem Objektträger und schließlich die Gesamtzellzahl gestimmt werden [62]. Mit Hilfe einer Zytozentrifuge (Shandon, Pitsburg, PA) erfolgte der Transfer der Zellen aus 80 – 200µl Zellsuspension auf einen Zytospin (3 min, 500 U/min). Danach folgte eine Färbung der Zytospins mit DiffQuick bzw. Nachfärbung mit Giemsa/May-Grünwald nach Pappenheim sowie eine differenzierte Auszählung von 100 – 500 Zellen. Aufgrund der eosinophilen Eigenschaft ließen sich die eosinophilen Granulozyten gut anfärben und differenzieren.

2.2.7. RNA-Isolation und Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die verwendeten Zellen ($0,3 - 1 \cdot 10^6$ Zellen pro Bedingung) stammen aus den oben beschriebenen Experimenten. Zur Gewinnung der Gesamt-RNA wurden die Zellen mit jeweils 350 µl RLT-Puffer lysiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Nach der RNA-Isolation mit dem RNeasy Mini Kit folgte die Umschreibung der RNA in cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure) mittels der RT (Reverse Transkription):

1. DNase Digestion von 1 µg RNA (19 µl) mit 1 µl DNase (1 U/µl) für 15 min bei 37°C
2. Denaturierung der RNA innerhalb von 10 min bei 70 °C durch Zugabe von 2,5 µl 25 mM EDTA
3. Synthese der cDNA bei 37°C für 60 min mittels der RT (Superskript III Reverse Transkriptase, 200 U) in der Gegenwart von 20 pmol Oligo dT-Primern

Anschließend wurden 1,5 bzw. 3 µl der erhaltenen cDNA-Menge für die PCR-Reaktion verwendet. Das 25 bzw. 50 µl Reaktionsvolumen enthielt 1,25 bzw. 2,5 U Taq DNA Polymerase und 20 pmol der entsprechenden Primerpaare (Tab. 4). Abhängig von den Primern und der entsprechenden Expression wurde die Annealing-Temperatur und die Zyklenanzahl geringfügig variiert (Tab. 4). Die Durchführung der cDNA-Amplifikation fand in einem Peltier-Thermal-Cycler (PTC 200, MJ Research, USA) nach folgendem Schema statt:

Programmname: 56/32 (Annealing-Temperatur: 56°C, Zyklen: 31)

1. Schritt: Aktivierung der Polymerase bei 94 °C für 5 min
2. Schritt: Denaturierung der DNA bei 94 °C für 30 sec
3. Schritt: Annealing der Primer an die DNA bei 56 °C für 45 sec
4. Schritt: Synthese der neuen DNA-Stränge bei 72 °C für 35 sec
5. Schritt. 31 mal Wiederholung der Schritte 2 – 4
6. Schritt: Elongation bei 72 °C für 2 min

Die Auftrennung erfolgte in einem 1%igen Agarosegel mit 500 ng/ml Ethidiumbromid von jeweils 5 – 15 µl PCR-Produkt. Es wurde ein 100 bp DNA-Ladder (0,05 µg/µl) zur Bildung der Markerbanden verwendet. Die Fotografie des Gels wurde unter UV-Licht durchgeführt und die Expressionsstärke der jeweiligen mRNA durch Relation der GAPDH-Bande mit der Bande der anderen Primer abgeschätzt.

2.2.8. Realtime-PCR

Für die Realtime-PCR wurden die gleichen cDNA-Proben wie in der oben beschriebenen PCR verwendet. Jeweils 1,5 µl der PCR-Proben wurden unter einer Clene-Cab-Haube (RNase freie Bedingungen) in insgesamt 25 µl Reaktionsvolumen aufgenommen, welches den SYBR[®] GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems, UK) und jeweils 20 pmol der entsprechenden Primerpaare (Tab. 4) beinhaltet.

Die Realtime-PCR wurde mittels dem Gerät 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, UK) mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

1. Schritt: Polymeraseaktivierung bei 95 °C für 10 min
2. Schritt: Denaturierung bei 95 °C für 15 sec
3. Schritt: Annealing bei 56 °C für 30 sec
4. Schritt: Synthese bei 72 °C für 30 sec
5. 39 mal Wiederholung der Schritte 2 – 4
6. Schritt: Elongation bei 72 °C für 5 min

Die Auswertung fand direkt im Anschluss an die Realtime-PCR mit einer entsprechenden Software statt. Auch hierbei wurde die Expressionsstärke der jeweiligen mRNA durch Relation der GAPDH-Expression mit der Expression der anderen Primer ermittelt.

2. Material und Methoden

Gen	Sequenz (Sense, Antisense)	Fragmentlänge	Annealingtemperatur/Zykluszahl
GAPDH (RT-PCR)	5'-CAT CAC CAT CTT CCA GGA GC-3' 5'-GAG GCA GGG ATG ATG TTC TG-3'	411	56/32
GAPDH (Realtime-PCR)	5'-TGG TCT CCT CTG ACT TCA AC-3' 5'-CCT GTT GCT GTA GCC AAA TT-3'	128	56/40
IL-3 (RT-PCR)	5'-CAT CTC TCA CAC ATT CCA GG-3' 5'-CAG TTC ACA CTC CAG GCA AT-3'	192	56/38
IL-5 (RT-PCR)	5'-ACT CTT GCA GGT AGT CTA GG-3' 5'-GGA ATA GGC ACA CTG GAG AGT CAA-3'	157	56/38
IL-13 (RT-PCR)	5'-CAT TGC TCT CAC TTG CCT TGG-3' 5'-CAG CTG TCA GGT TGA TGC TC-3'	159	56/38
TGF- β (Realtime-PCR)	5'-CAA GTG GAC ATC AAC GGG TT-3' 5'-GCT CCA AAT GTA GGG GCA GG-3'	297	56/40
TNF- α (RT-PCR)	5'-CAG ATA GAT GGG CTC ATA CCA GGG-3' 5'-GCC CTC TGG CCC AGG CAG TCA G-3'	376	58/38
IFN- γ (RT-PCR)	5'-GGT CAT TCA GAT GTA GCG GA-3' 5'-TGG ATG CTC TGG TCA TCT TT-3'	149	56/40
MCP-1 (RT-PCR)	5'-CTT CTG TGC CTG CTG CTC AT-3' 5'-CGG AGT TTG GGT TTG CTT GTC-3'	272	56/38
MCP-3 (RT-PCR)	5'-GCC TCT GCA GCA CTT CTG TG-3' 5'-CAC TTC TGT GTG GGG TCA GC-3'	239	56/38
MIP-1 α (RT-PCR)	5'-CTC TGC ATC ACT TGC TGC TGA CAC-3' 5'-CAC TCA GCT CCA GGT CGC TGA C-3'	208	56/38
MIP-1 β (RT-PCR)	5'-GCT AGT AGC TGC CTT CTG CTC TCC-3' 5'-CAG TTC CAG CTG ATA CAC GTA CTC C-3'	237	56/38
RANTES (RT-PCR)	5'-CTC CCC ATA TTC CTC GGA CA-3' 5'-GTT GAT GTA CTC CCG AAC CC-3'	190	56/38
IL-8 (RT-PCR)	5'-CTG AGA GTG ATT GAG AGT GG-3' 5'-ACA ACC CTC TGC ACC CAG TT-3'	113	56/38
Eotaxin (RT-PCR)	5'-CTG CTG CTC ATA GCA GCT GC-3' 5'-CTT CAT GGA ATC CTG CAC CC-3'	231	56/38
Eotaxin-2 (RT-PCR)	5'-GCC AGG ATA TCT CTG GAC AG-3' 5'-GGAGTGATCTTACCACCAA-3'	160	56/38
Eotaxin-3 (RT-PCR)	5'-GCC TGA TTT GCA GCA TCA TG-3' 5'-TCC TCG GAT GAC AAT TCA GC-3'	305	56/38

Tab. 4: Verwendete Primersequenzen, Fragmentlängen und Zyklusprogramme

2.2.9. Westernblot

Direkt nach dem Stimulationsexperiment wurden die Zellen bei 2500 U/min, 5 min und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in Extraktionspuffer mit Zusatz von Proteaseinhibitoren lysiert und bei -80°C aufbewahrt. Die Darmmukosa wurde in Extraktionspuffer homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand direkt für den Westernblot verwendet. Die Verdünnung der Lysate erfolgte im Verhältnis 1:2 mit Probenpuffer und die Denaturierung für 5 min bei 95°C. Anschließend wurden die Proben auf ein 4%iges SDS Acrylamid-Sammelgel

aufgetragen und zur Bildung der Markerbanden der BioRad Low Range Marker verwendet. Es folgte die Auftrennung in einem 12%igen SDS Acrylamid-Trenngel für 90 min bei 120 V. Die im Trenngel enthaltenen Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dies erfolgte durch den durch den Bau eines „Sandwich“ nach dem Prinzip „Fast Blot/semidry“: Kathode, 3 x Filterpapier, Acrylamid-Trenngel, Nitrozellulosemembran, 3 x Filterpapier, Anode. Der Transfer lief in einer mit Westernblot-Puffer gefüllten Blotkammer (4 h, 40 V). Danach erfolgte eine Inkubation über Nacht der Nitrozellulosemembran bei 4°C mit 5%igem Magermilchpulver, gelöst PBS Tween, um unspezifische Bindungen des im Folgenden eingesetzten Antikörpers zu blockieren. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS-Tween und danach die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper (mouse antihuman TGF- β , Verdünnung 1:100) für 90 min bei Raumtemperatur. Nach zwei erneuten Waschschrten mit PBS-Tween folgte die Inkubation der Membran für 90 min bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (ECL antimouse IgG, Verdünnung 1:5000). Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran 3 ml mit PBS-Tween gewaschen, um unspezifische Bindungen zu entfernen. Der Sekundärantikörper wurde mittels Chemilumineszenz Reagenz auf dem Hyperfilm™ MP dargestellt. Zur Analyse des TGF- β im Westernblot wurden $0,32 \cdot 10^6$ lysierte eosinophile Granulozyten (100% rein), 5 μ g Proteine der Darmbiopsie und 2,5 ng sowie 500 pg TGF- β 1 verwendet.

2.2.10. Statistik

Die Daten werden mit dem Mittelwert \pm der Standardabweichung dargestellt. Differenzen zwischen den Gruppen wurden mittels des two-tailed paired t-test bestimmt und ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% ($p < 0,05$) als signifikant bewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Isolation und Aufreinigung von humanen eosinophilen Granulozyten

3.1.1. Isolation und Aufreinigung von humanen eosinophilen Granulozyten aus peripherem venösen Blut (mit und ohne Percoll-Dichtegradient)

Zunächst sollte die optimale Methode zur Isolation und Aufreinigung von eosinophilen Granulozyten etabliert werden. In der Literatur wurden zwei Methoden beschrieben, die sich vornehmlich nur durch einen Percoll-Dichtegradienten unterschieden [31;34;40;49]. Beide Methoden wurden getestet. Vor jeder Anreicherung wurde von der Abteilung Hämatologie der Medizinischen Hochschule Hannover ein Differentialblutbild angefertigt. Nach jedem Isolations- bzw. Aufreinigungsschritt wurden die Zellen in der Zählkammer nach Neubauer mit Trypanblau ausgezählt und auf mit DiffQuick gefärbten Zytospins differenziert. Bei der Differenzierung blieben die Erythrozyten unberücksichtigt. Zunächst wurde die Anreicherungsmethode mit der Dichtezentrifugation im Percoll-Gradienten angewendet. Für die Aufreinigung mit dem Percoll-Gradienten wurde peripheres venöses Blut mit $2,0 \pm 0,7\%$ eosinophilen Granulozyten im Differentialblutbild verwendet ($n = 4$). Das Blut sedimentierte in der Dextran-Lösung bis sich ein Überstand von mindestens $\frac{1}{3}$ des eingesetzten Volumens gebildet hatte. Danach trennte die Dichtezentrifugation mit Ficoll-Lösung den Sedimentationsüberstand so auf, dass sich im Ficoll-Ring Monozyten, basophile Granulozyten sowie Lymphozyten und im Pellet neutrophile und eosinophile Granulozyten ansammelten. Nach der Lyse der verbliebenen Erythrozyten mit kaltem Wasser, wurde die Zellsuspension im Percoll-Dichtegradienten erneut zentrifugiert. Die neutrophilen Granulozyten bildeten hauptsächlich den Percoll-Ring und die eosinophilen Granulozyten das Pellet. Zur magnetischen Anreicherung mittels MACS-System wurden CD16-Microbeads verwendet. CD16 wird von neutrophilen Granulozyten, NK-Zellen, aktivierten Makrophagen und von einigen T-Zell-Subtypen exprimiert und membranständig präsentiert. Eosinophile Granulozyten exprimieren CD16 hingegen nicht [63-65]. Daher konnte durch die MACS-Aufreinigung die verbliebenden neutrophilen Granulozyten aus der Zellsuspension des Pellets entfernt werden. Resultat war eine signifikante Erhöhung der Reinheit von $4,8 \pm 2,2\%$ nach

Sedimentation auf $92,8 \pm 6,4\%$ Eosinophile nach MACS-Aufreinigung mit der CD16-Negativselektion ($n = 4$, Abb. 3). Einhergehend mit der ansteigenden Reinheit der eosinophilen Granulozyten verringerte sich die Anzahl dieser Zellen. Nach der Sedimentation konnten $15,5 \pm 5,6^* 10^6$ eosinophile Granulozyten detektiert werden, während nach Verwendung des MACS-Systems nur noch $5,4 \pm 3,2^* 10^6$ Eosinophile zählbar waren ($n = 4$). Abb. 4 zeigt dieses Resultat in Prozentwerten, die jeweils auf die Anzahl der Eosinophilen nach der Sedimentation bezogen wurden.

Die beschriebene Dichtezentrifugation im Percoll-Gradienten führte nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Eosinophilenreinheit (Abb. 3). Dieser Zwischenschritt ging jedoch mit einem hohen Zellverlust einher (Abb. 4). Zum Vergleich wurde die Aufreinigung ohne den Percoll-Zwischenschritt getestet [40;49]. Die Bestimmung des Anteils der Eosinophilen im peripheren venösen Blut durch die Abteilung Hämatologie der Medizinischen Hochschule Hannover ergab hierfür im Differentialblutbild $4,4 \pm 2,9\%$ ($n = 11$). Zum Quantifizieren der Zellen wurde die Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau verwendet. Die Differenzierung der Zellen (ohne Erythrozyten) erfolgte durch Zytospins, die mit QuickDiff gefärbt wurden. Die Blutzellen sedimentierten in Dextran-Lösung bis sich ein Überstand von mindestens $\frac{1}{3}$ des eingesetzten Volumens gebildet hatte. Nach der Auftrennung des Überstandes im Dichtegradienten mit Ficoll-Lösung wurde eine Lyse der Erythrozyten mit kaltem Wasser durchgeführt. Es folgte die magnetische Negativselektion mittels MACS-System mit CD16-Microbeads. Die Reinheit der eosinophilen Granulozyten konnte von $5,6 \pm 3,8\%$ nach der Sedimentation auf $93,1 \pm 8,2\%$ Eosinophile nach der Durchführung des MACS signifikant gesteigert werden ($n = 11$). Somit beeinflusste das Auslassen des Percoll-Dichtegradienten die insgesamt erzielte Reinheit nicht, da die Aufreinigung mit Percoll-Dichtegradienten ähnlich hohe Anteile von Eosinophilen aufwies (Abb. 3). Ein Unterschied bestand jedoch in der Ausbeute der Zellen. So ergab sich nach der gesamten Aufreinigung ohne den Percoll-Zwischenschritt eine nicht signifikante Abnahme der Zellzahl um $6,5 \pm 3,4^* 10^6$ eosinophile Granulozyten ($n = 11$), während durch den zusätzlichen Percoll-Schritt dieser Zellverlust mit $10,1 \pm 3,3^* 10^6$ Eosinophilen signifikant war ($p = 0,02$, $n = 4$). In Abb. 4 ist die Abnahme der Zellzahl prozentual dargestellt, wobei die Anzahl der Eosinophilen nach der Sedimentation jeweils als 100% gesetzt wurde.

3. Ergebnisse

Bei Betrachtung aller zu dieser Fragestellung durchgeführten Experimente konnten aus $118,1 \pm 6,4$ ml Blut $19,4 \pm 11,6^* 10^6$ Eosinophile mit einem Anteil von $5,6 \pm 3,3\%$ mittels der Dextran-Sedimentation isoliert werden ($n = 17$).

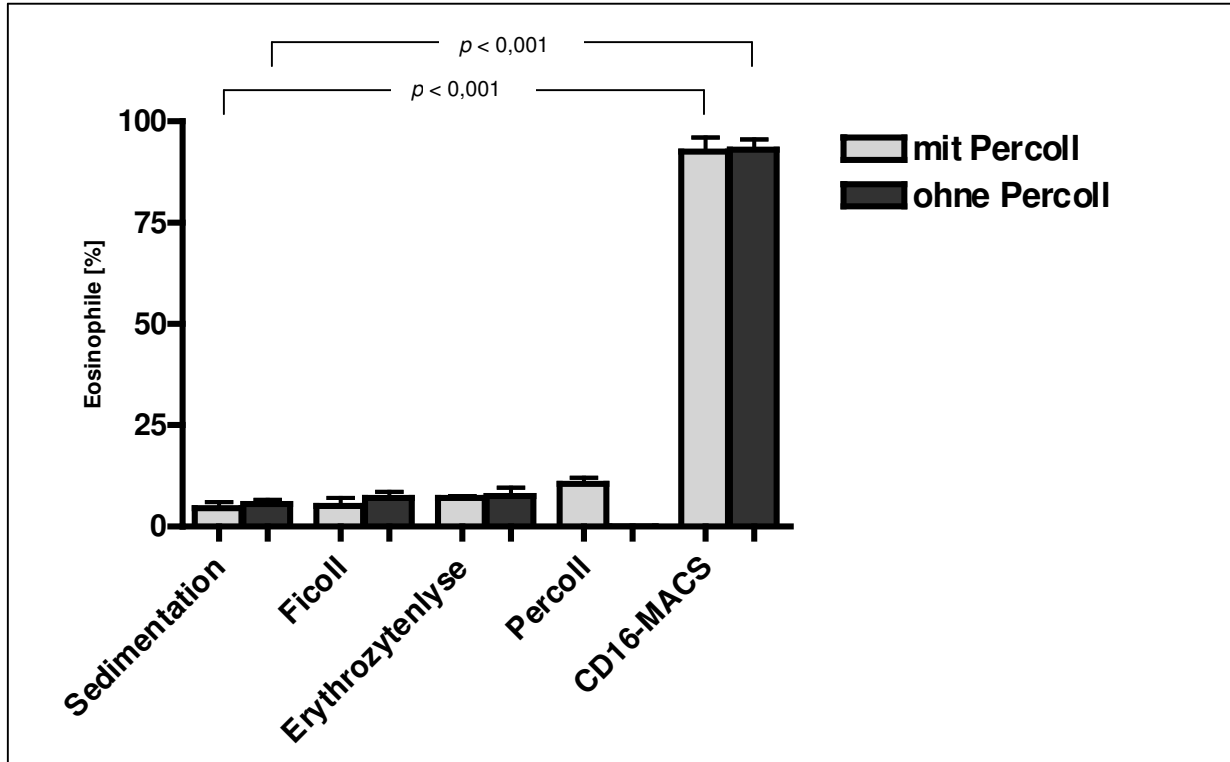


Abb. 3: Anstieg der Reinheit von humanen eosinophilen Granulozyten während der Isolation und Aufreinigung mit und ohne Percoll-Dichtegradient aus peripherem venösen Blut.

Die Differenzierung wurde auf mit DiffQuick gefärbten Zytospins (Erythrozyten unberücksichtigt) durchgeführt. Die Resultate sind Mittelwerte (\pm Standardabweichung; mit Percoll: $n = 4$, ohne Percoll: $n = 11$). Die Reinheit der Eosinophilen stieg nur geringfügig durch die Dichtezentrifugation mit Ficoll-Lösung an. Die Lyse der Erythrozyten veränderte die berechnete Reinheit der Zellsuspension nicht, weil die Erythrozyten beim Differenzieren nicht berücksichtigt wurden. Auch die zusätzliche Zentrifugation in Percoll-Lösung ergab keine weitere signifikante Reinheits-erhöhung. Mittels magnetischer CD16-Negativselektion (MACS-System) erhöhte sich der Anteil der Eosinophilen deutlich. Die Reinheit der eosinophilen Granulozyten nahm signifikant von der Sedimentation bis nach der MACS-Aufreinigung mit der CD16-Negativselektion zu, unabhängig der Durchführung eines Percoll-Zwischenschritts.

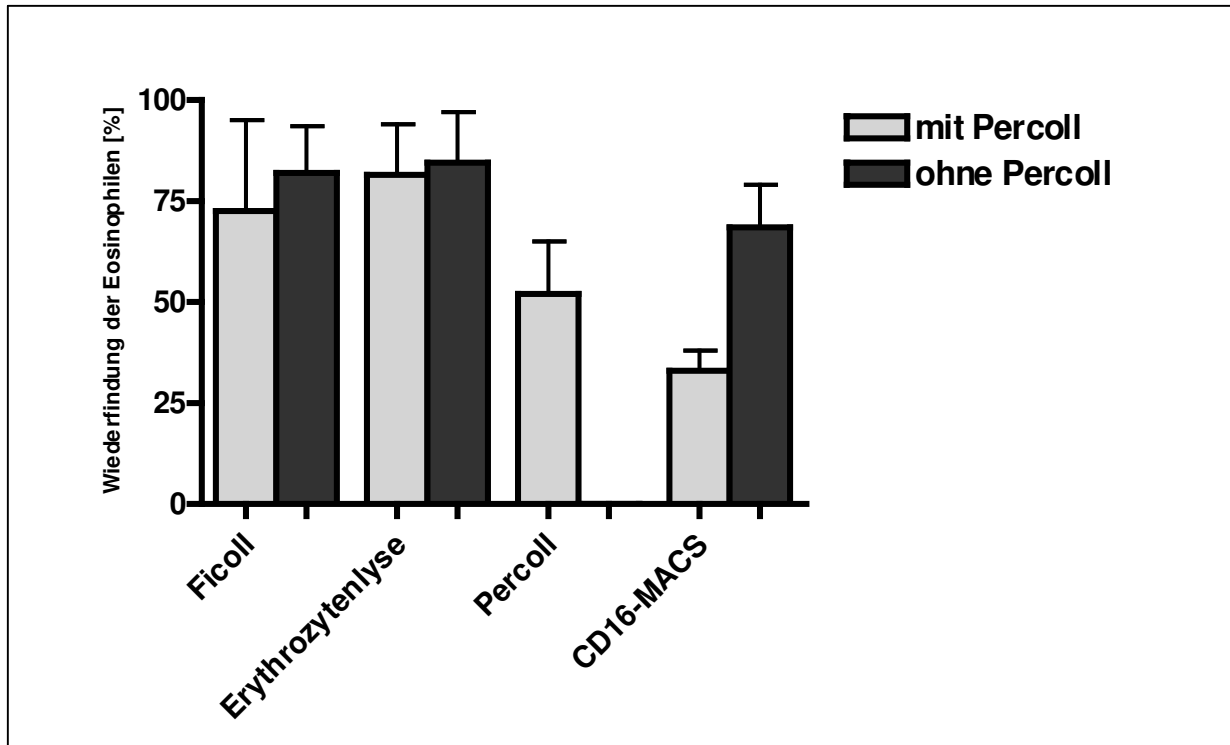


Abb. 4: Wiederfindung der humanen eosinophilen Granulozyten während der Isolation und Aufreinigung mit und ohne Percoll-Dichtegradient aus peripherem venösen Blut.

Die Zellen wurden mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer quantifiziert. Es sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung; mit Percoll: $n = 4$, ohne Percoll: $n = 11$) gezeigt. Als 100% wurde jeweils die Zellanzahl der Eosinophilen nach der Sedimentation gesetzt. Während der Isolation und Aufreinigung nahm die Anzahl an eosinophilen Granulozyten ab. Der Zellverlust war durch den zusätzlichen Percoll-Schritt am höchsten, so dass nach der Aufreinigung mit dem Percoll-Dichtegradienten ein höheres Defizit an Zellen vorlag als ohne diesen Zwischenschritt.

Nach der Isolation und Anreicherung der eosinophilen Granulozyten aus Blut ohne den Percoll-Gradienten erfolgte die Nachfärbung mit Giemsa/May-Grünwald und Fotografie der Zytospins. Der Anteil der Eosinophilen betrug nach der Sedimentation 1 – 14% ($5,6 \pm 3,8\%$, $n = 11$, Abb. 5A). Nach der Dichtezentrifugation mit Ficoll-Lösung enthielt die Zellsuspension 2 – 20% ($7,1 \pm 5,3\%$, $n = 11$) eosinophile Granulozyten (Abb. 5B). Durch die Lyse der verbliebenen Erythrozyten mit kaltem Wasser änderten sich die berechneten Reinheit der Eosinophilen nicht wesentlich, da beim Differenzieren Erythrozyten nicht berücksichtigt wurden (Abb. 5C). Das Resultat der magnetischen Negativselektion mittels MACS-System mit dem Zielantigen CD16 waren 71 – 100% ($93,1 \pm 8,2\%$, $n = 11$) reine eosinophile Granulozyten (Abb. 5D).

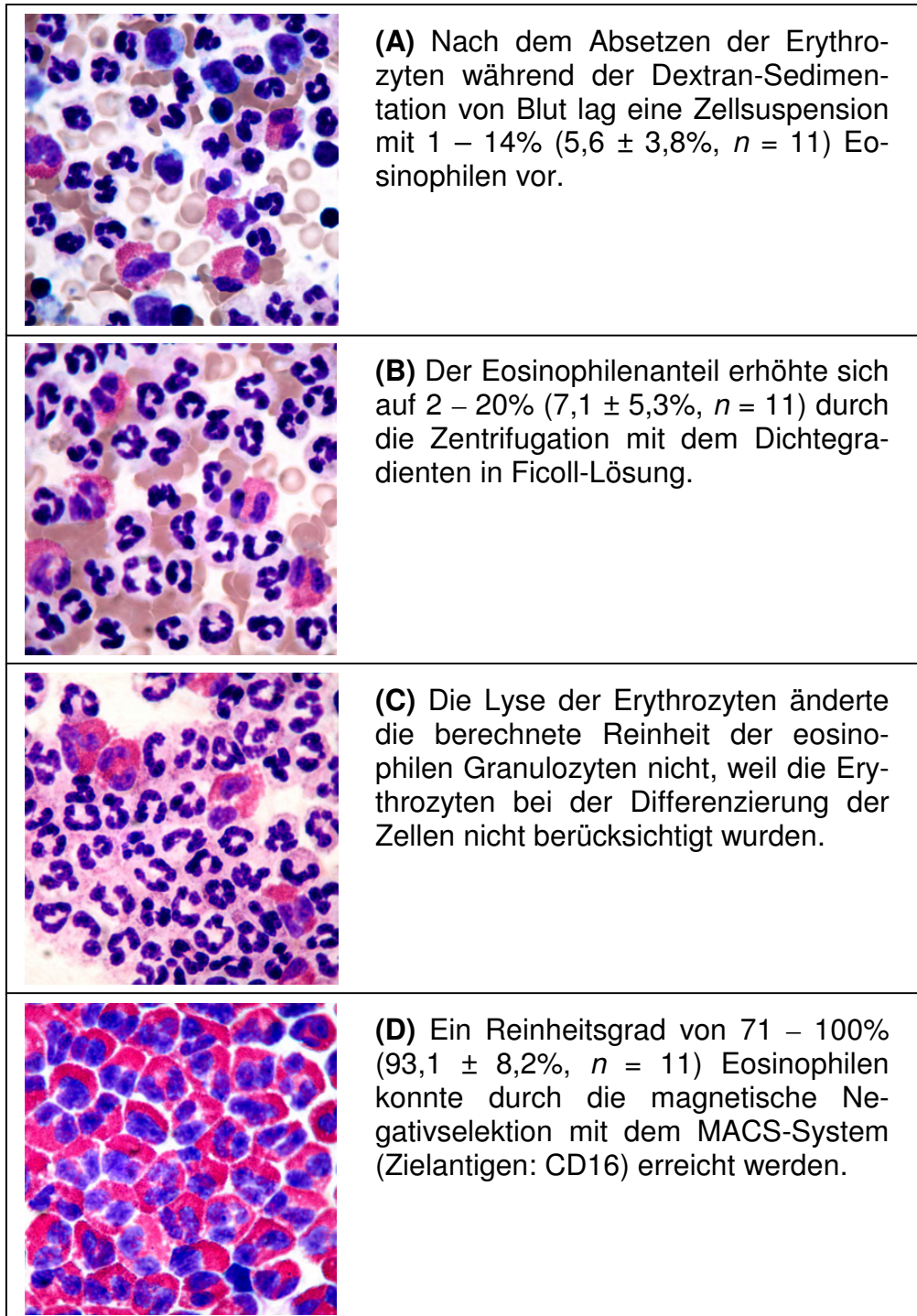


Abb. 5: Isolation und Aufreinigung humaner eosinophiler Granulozyten aus peripherem venösen Blut ohne Durchführung der Percoll-Dichtezentrifugation. Die verwendeten Präparate waren mit Giemsa/May-Grünwald gefärbte und fotografierte Zytospins. Bei der Differenzierung der Zellen blieben die Erythrozyten unberücksichtigt.

3.1.2. Isolation und Aufreinigung von humanen eosinophilen Granulozyten aus Darmmukosa

Aufgrund der mangelnden Datenlage über die Isolation und Anreicherung von eosinophilen Granulozyten aus Darmgewebe musste zunächst eine Etablierung der Methode stattfinden. Um eine Einzelzellsuspension herzustellen, wurde die in der Arbeitsgruppe Bischoff etablierte Methode zur Isolation von intestinalen Mastzellen verwendet. Die Zellzahl wurde mit Trypanblau-gefärbten Zellen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Differenzierung der Zellen erfolgte durch QuickDiff gefärbte Zytopins ohne Berücksichtigung der Erythrozyten. Aus $13,6 \pm 7,4$ g Darmmukosa konnte eine Einzelzellsuspension mit $21,7 \pm 14,5 \cdot 10^6$ eosinophilen Granulozyten isoliert werden, die einen Reinheitsgrad von $11,9 \pm 5,6\%$ hatte ($n = 7$). Zur Kultivierung wurden davon $14,5 \pm 9,3 \cdot 10^6$ Zellen mit einer Konzentration von ungefähr $4 \cdot 10^6/\text{ml}$ Zellen in Kulturmedium mit 10% FCS ausgesät. Außerdem wurden dem Medium IL-5 (10 ng/ml), ein Wachstumsfaktor für eosinophile Granulozyten, zugefügt [5;6]. Es folgte die Kultivierung über Nacht im Brutschrank bei 37°C. Die Reinheit der isolierten Einzelzellsuspension konnte durch die Kultur über Nacht nicht wesentlich erhöht werden. Auch aus der Durchführung eines Ficoll-Gradienten resultierte keine signifikante Erhöhung der Reinheit. Erst die Verwendung der Positivselektion von CD15-positiven Zellen mit Hilfe des MACS-System führte zu einer Erhöhung der Reinheit an eosinophilen Granulozyten. CD15 wird von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie von einigen Monozyten-Subtypen exprimiert [66;67]. Beim Vergleich der magnetischen Zellseparation direkt nach der Isolation und nach Kultur über Nacht ergab sich eine Reinheit der Eosinophilen von 3% bzw. 24% im direkten Anschluss und 61% bzw. 77% nach Kultur über Nacht ($n = 2$). Insgesamt resultierte eine signifikante Zunahme der Reinheit an eosinophilen Darmgranulozyten von $11,9 \pm 5,6\%$ in der Einzelzellsuspension auf $77,6 \pm 8,4\%$ nach der CD15-Positivselektion ($n = 7$, Abb. 6A). Der Verlust der Zellen betrug von der Zellsuspension bis nach der MACS-Durchführung insgesamt $88,8 \pm 6,0\%$ eosinophile Granulozyten. Die meisten Zellen gingen dabei bei der Kultur über Nacht verloren ($n = 7$, Abb. 6B).

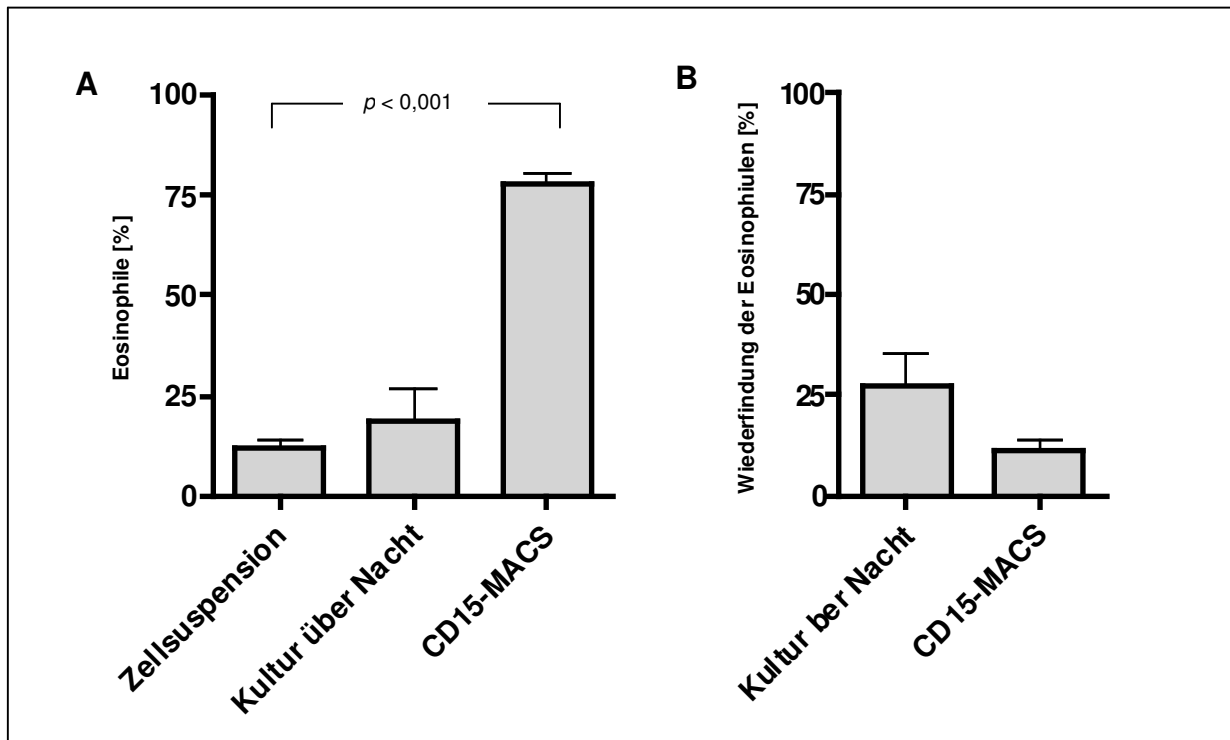


Abb. 6: Aufreinigung und Wiederfindung der humanen eosinophilen Granulozyten aus Darmmukosa.

Die Quantifizierung wurde mit Trypanblau-gefärbten Zellen in der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. In mit QuickDiff gefärbten Zytospins wurden die Zellen ohne Berücksichtigung der Erythrozyten differenziert. Es sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung, $n = 7$) dargestellt. **(A)** Insgesamt erhöhte sich der Reinheitsgrad nach der Aufreinigung signifikant. Den größten Reinheitsgewinn brachte die Anwendung der magnetischen Zellseparation des MACS-Systems mit der CD15-Positivselektion. **(B)** Der größte Zellverlust war durch die Kultivierung über Nacht bedingt. Angegeben ist die Wiederfindung der Eosinophilen in Prozent, die sich jeweils auf die Zellanzahl in der Zellsuspension bezieht.

Nach der Differenzierung der Zellen mittels Zytospin und Giemsa/May-Grünwald-Färbung wurden die Zytospins fotografiert. Bei der Angabe der relativen Anteile der Eosinophilen wurden Erythrozyten beim Differenzieren nicht beachtet. In der Einzelzellsuspension betrug der Anteil der Eosinophilen 5 – 22% ($11,9 \pm 5,6\%$, $n = 7$, Abb. 7A). Die Kultivierung in 10% FCS-Medium mit IL-5 (10 ng/ml) über Nacht ergab nach der Ernte der Zellen 4 – 50% ($20,5 \pm 19,1\%$, $n = 7$) eosinophile Granulozyten (Abb. 7B). Durch die CD15-Positivselektion mittels MACS-System wurde eine Reinheit von 65 – 91% ($77,6 \pm 8,4\%$, $n = 7$) eosinophilen Granulozyten erreicht (Abb. 7C). Abb. 7D stellt im Vergleich zur Abb. 7C dar, dass manche dieser Zellen auch stärker degranuliert waren und eine undeutlichere Begrenzung der Zellmembran zeigten. Beide Anzeichen deuteten darauf hin, dass die Aufarbeitung die Vitalität der Zellen zumindest teilweise reduzierte.

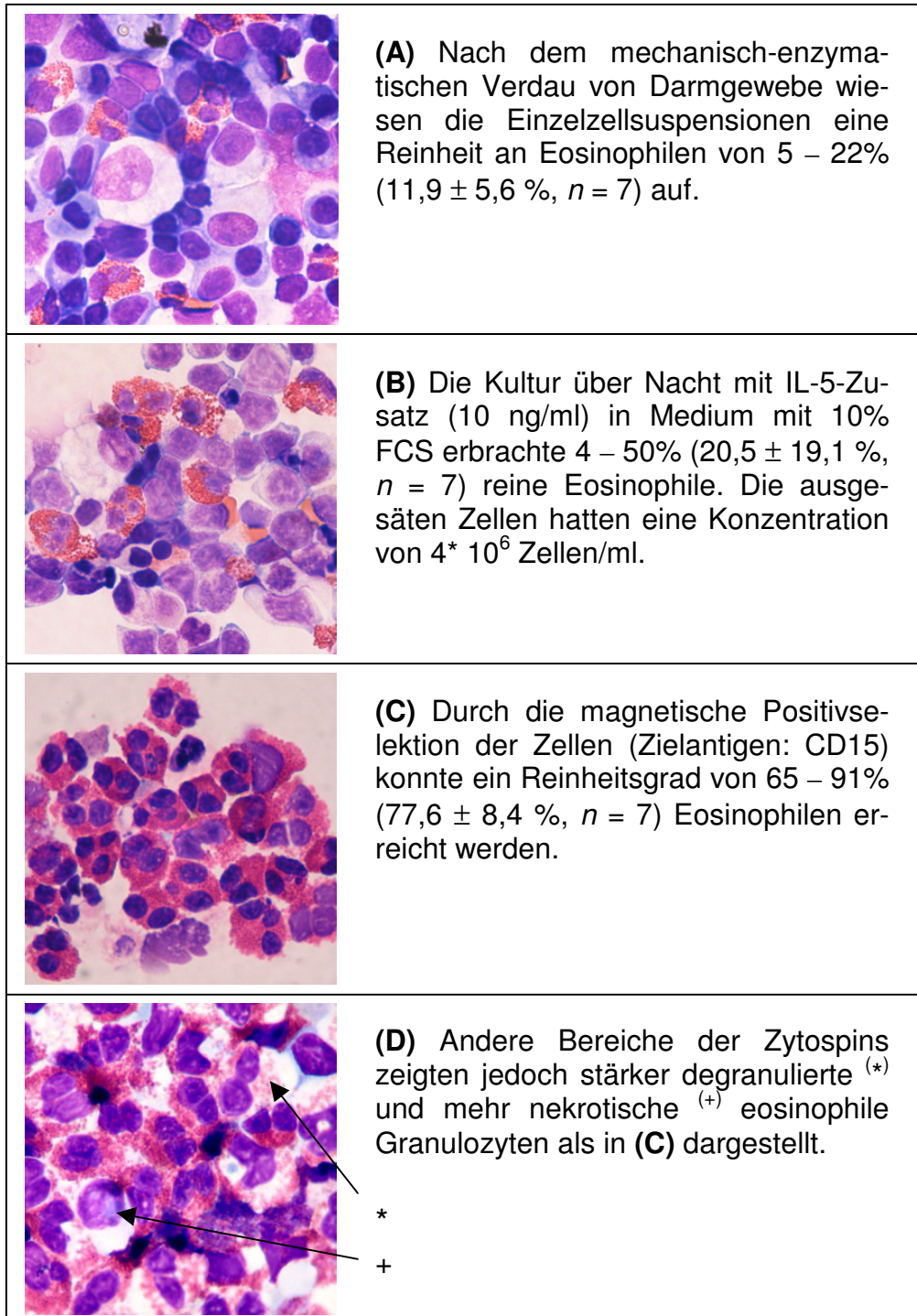


Abb. 7: Isolation und Aufreinigung humaner eosinophiler Granulozyten aus Darmmukosa

Die Zellen sind auf mit Giemsa/May-Grünwald gefärbten Zytospins differenziert und davon fotografiert worden. Die Differenzierung erfolgte ohne Berücksichtigung der Erythrozyten.

3.2. Regulation der Mediatorexpression und -Freisetzung aus humanen eosinophilen Granulozyten aus Blut und Darmmukosa

3.2.1. Auswahl der Stimulanzen

Für die in vitro Stimulation von eosinophilen Granulozyten ist Cytochalasin B notwendig. IL-5 ist als „primende“ Substanz beschrieben, die Eosinophile in Bezug auf die Degranulation und Neusynthese von Proteinen beeinflusst. Als potente Stimuli werden Ionophor und fMLP genannt. Hauptsächlich werden diese Substanzen für die Regulation der ECP- und LTC₄-Freisetzung verwendet [6;27;28;34;35]. Es zeigte sich, dass Cytochalasin B und IL-5 allein oder in Kombination keine deutliche Aktivierung der eosinophilen Granulozyten aus Blut bewirken. Stimuli wie fMLP induzieren nach Zugabe dieser beiden Substanzen eine höhere Mediatorfreisetzung als ohne Stimulation [34].

In dieser Arbeit wurden die angereicherten eosinophilen Granulozyten in HACM-Puffer aufgenommen und entsprechend stimuliert. Nach der Stimulation im Wasserschüttelbad bei 37°C wurde die Reaktion durch Kühlung auf Eis beendet.

3.2.2. Regulation der Freisetzung von eosinophilem kationischen Protein (ECP)

Die Serumkonzentration von ECP wird als klinischer Indikator für die Aktivierung des Immunsystems bei allergischen Erkrankungen verwendet [23;68]. ECP ist spezifisch für eosinophile Granulozyten [11]. Deshalb wurde zunächst die Stimulation der ECP-Abgabe aus Blut- und Darneosinophilen untersucht. Zur Ermittlung der ECP-Proteinmenge wurden die Proben mit dem Gerät „UniCAP 100“ (Pharmacia Diagnostics, Schweden) analysiert. Vor dem Experiment wurden jeweils Eosinophile abgenommen, zentrifugiert und unstimuliert in Wasser lysiert um die ECP-Freisetzung in Prozent bestimmen zu können. Die Inkubation der eosinophilen Granulozyten erfolgte in HACM-Puffer mit Cytochalasin B (5 µg/ml, 10 min) sowie IL-5 (10 ng/ml, 90 min) im 37°C warmen Wasserbad. Danach erhielten die Zellen für 30 min Ionophor (1 µM) oder fMLP (1 µg/ml). Es lief jeweils eine unstimulierte Kontrollbedingung mit. Nach der Inkubation wurden die Zellen sedimentiert und der ECP-Proteingehalt in den Überständen bestimmt. Bei den Eosinophilen aus Blut führte

3. Ergebnisse

Ionophor zu keiner relevanten Steigerung der abgegebenen ECP-Menge. Dagegen bewirkte fMLP eine signifikant erhöhte ECP-Freisetzung auf $78,2 \pm 16,2 \%$ ($n = 4$). Die Analyse des Zusatzes von Ionophor oder fMLP bei eosinophilen Darmgranulozyten lieferte keine signifikante Änderung des ausgeschütteten ECP-Proteins im Vergleich zur unstimulierten Probe ($n = 4$). Bei der Betrachtung der relativen basalen ECP-Sezernierung zeigten eosinophile Granulozyten aus Blut höhere Werte als diese Zellen aus Darmgewebe. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 8). In Abb. 9 sind die entsprechenden absoluten Werte des sezernierten ECPs dargestellt. Somit bewirkte der Stimulus fMLP eine signifikant erhöhte Ausschüttung von $852,1 \pm 512,4 \text{ ng ECP}/10^6 \text{ Eosinophile}$ ($n = 4$). Die durchschnittliche basale ECP-Abgabe der intestinalen eosinophilen Granulozyten ergab ca. 7-mal so hohe Werte im Vergleich zu Bluteosinophilen ($n = 4$).

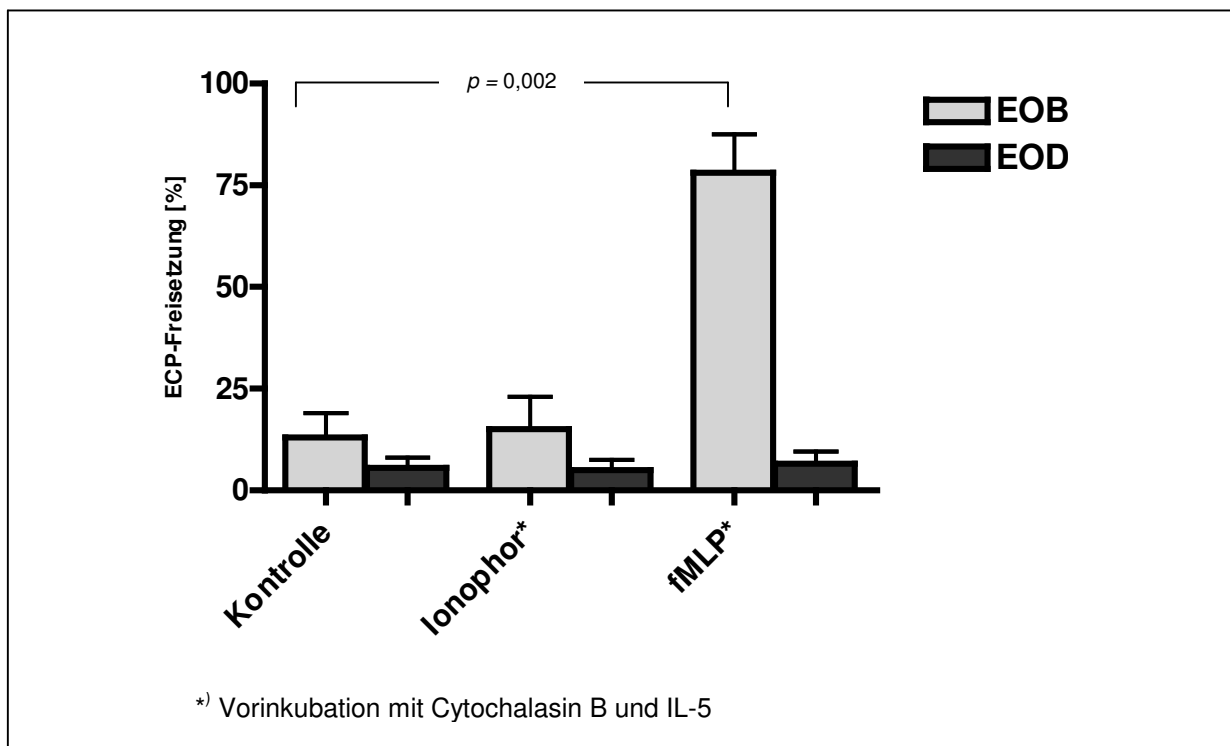


Abb. 8: fMLP induziert die Freisetzung von ECP aus eosinophilen Granulozyten aus Blut (EOB), aber nicht aus intestinalen Eosinophilen (EOD).

Dargestellt ist die relative Freisetzung von ECP in Prozent als Mittelwerte (\pm Standardabweichung, jeweils $n = 4$) analysiert mit dem Gerät „UniCAP 100“. Die ECP-Bestimmung erfolgte in HACM-Überständen der Zellen. Um die sezernierten Anteile des ECPs angeben zu können, wurde der Gesamtgehalt an ECP in mit Wasser lysierten Eosinophilen bestimmt. Dazu wurden Zelllysate vor dem Experiment angefertigt. Im Experiment wurden zuerst Cytochalasin B ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$, 10 min) sowie IL-5 ($10 \text{ ng}/\text{ml}$, 90 min) im 37°C warmen Wasserbad zugefügt. Es folgten Ionophor ($1 \mu\text{M}$) oder fMLP ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) für 30 min. Die Kontrollprobe erhielt keinen Zusatz.

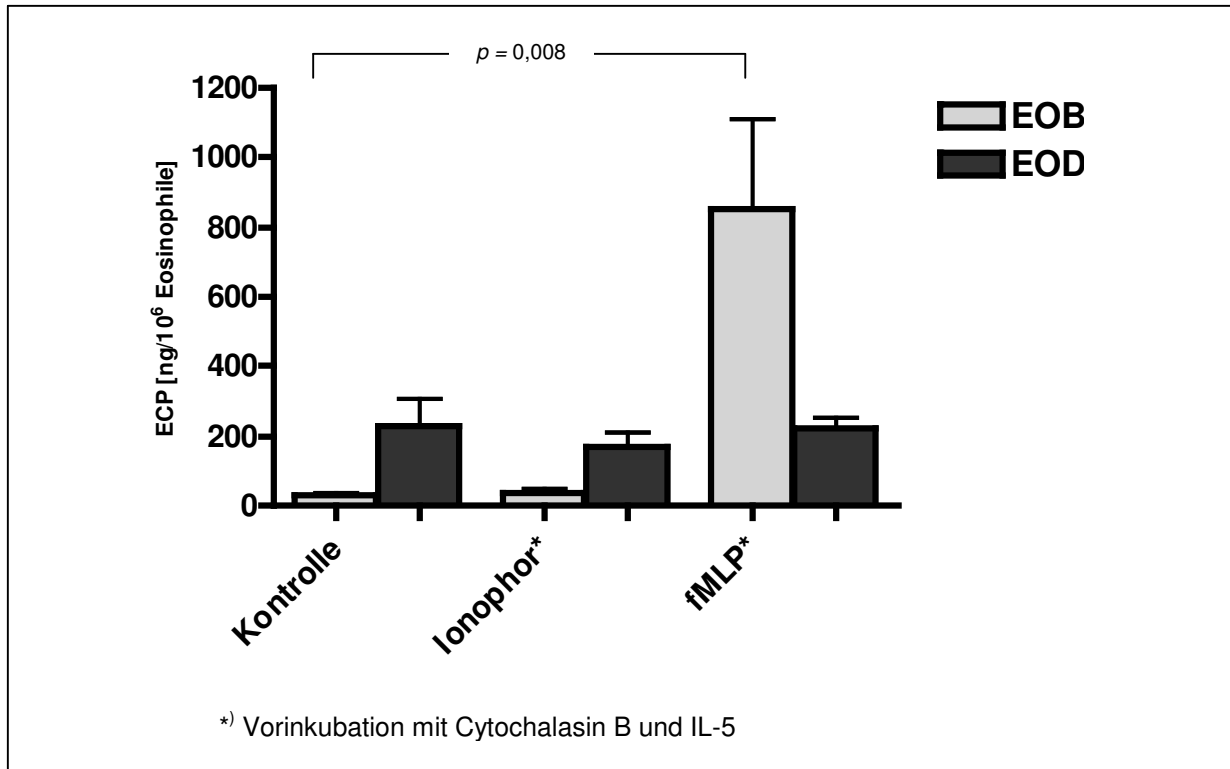


Abb. 9: fMLP induziert die Freisetzung von ECP aus eosinophilen Granulozyten aus Blut (EOB), aber nicht aus intestinalen Eosinophilen (EOD).

Die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) bestehen aus jeweils $n = 4$ Experimenten. Der Gehalt an ECP wurde mit dem Gerät „UniCAP 100“ in den HACM-Überständen der Zellen analysiert. Zuerst wurden Cytochalasin B (5 μ g/ml, 10 min) sowie IL-5 (10 ng/ml, 90 min) und dann Ionophor (1 μ M) oder fMLP (1 μ g/ml) für 30 min im 37°C warmen Wasserbad zugefügt. Die Kontrollprobe bleibt unstimuliert.

3.2.3. Regulation der Freisetzung von Leukotrien C₄ (LTC₄)

Eosinophile Granulozyten sind u.a. die Hauptquelle für LTC₄ [27]. Die Analyse der Ausschüttung von LTC₄ bei eosinophilen Granulozyten aus Blut ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden [34;69;70]. Daher eignete sich dieses Leukotrien zum weiteren Vergleich der Blut- und Darmeosinophilen. Zur Untersuchung von LTC₄ wurden ebenfalls sedimentierte HACM-Überstände von eosinophilen Granulozyten mit dem ELISA für cysteinyl-Leukotriene (LTC₄, Biotrend, Assay Designs Inc., USA) gemessen. Die Zellen erhielten für 30 min Ionophor (1 μ M) oder fMLP (1 μ g/ml) im 37°C warmen Wasserbad. Auch hier wurde zuvor eine Inkubation mit Cytochalasin B (5 μ g/ml, 10 min) und IL-5 (10 ng/ml, 90 min) durchgeführt. Zusätzlich gab es jeweils eine Kontrollbedingung ohne Substanzzusatz. Eosinophile Granulozyten aus Blut sezernierten eine signifikant gesteigerte LTC₄-Proteinmenge nach Aktivierung mit Ionophor ($1,28 \pm 0,21$ ng LTC₄/10⁶ Eosinophile) und fMLP ($8,87 \pm 2,28$ ng LTC₄/10⁶ Eo-

3. Ergebnisse

sinophile) ($n = 3$, Abb. 10). Bei den intestinalen Gewebeseosinophilen zeigte sich das gleiche Muster der Aktivierung. So wurde die LTC₄-Freisetzung durch Ionophor von $0,93 \pm 0,32$ ng/10⁶ Eosinophilen und durch fMLP von $10,16 \pm 3,54$ ng/10⁶ Eosinophilen induziert ($n = 3$, Abb. 10).

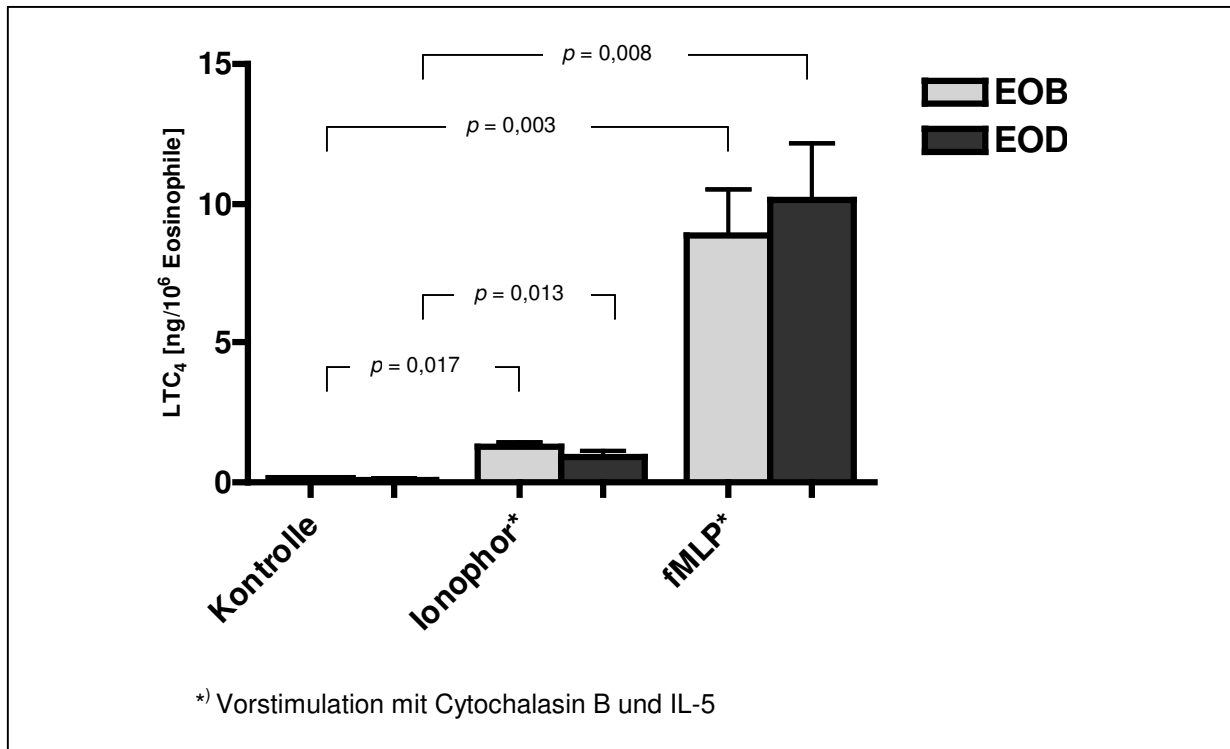


Abb. 10: Ionophor, aber noch deutlicher fMLP steigerte die Freisetzung von LTC₄ aus Blut- (EOB) und Darmeosinophilen (EOD).

Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) aus sedimentierten HACM-Überständen von jeweils drei Experimenten gemessen im ELISA. Verwendete Substanzen waren Cytochalasin B (5 μ g/ml, 10 min) sowie IL-5 (10 ng/ml, 90 min) zur Vorinkubation im 37°C warmen Wasserbad. Die weitere Stimulation erfolgte mit Ionophor (1 μ M, 30 min) oder fMLP (1 μ g/ml, 30 min). Die Kontrollprobe hatte keinen Zusatz.

3.2.4. Regulation der Produktion und Freisetzung von TGF- β 1

Das Zytokin TGF- β 1 hat neben der Regulation der Immunantwort pleiotrope Wirkungen [55]. Es konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass intestinale eosinophile Granulozyten 90% der TGF- β 1-positiven Darmzellen sowohl im pathologischen als auch im nicht-pathologischem Gewebe sind [57;58]. Aus diesem Grund wurden die eosinophilen Granulozyten aus Blut und Darmmukosa in Bezug auf TGF- β 1 untersucht. Zunächst wurde der TGF- β 1-Gehalt des Kulturmediums für Darmeosinophile ohne Zellen im ELISA bestimmt. Denn in der Regel wurden die Zellen zur Kultivierung in FCS-haltigem Medium resuspendiert. In Medium mit 10% FCS, wie es zur Kultivierung der Einzelzellsuspension aus Darmmukosa verwendet wurde, konnte eine Konzentration von $1144,93 \pm 40,17$ pg TGF- β 1/ml bestimmt werden ($n = 3$, Abb. 11). Das Kulturmedium ohne FCS lieferte dagegen keinen messbaren TGF- β 1-Wert (Daten nicht gezeigt).

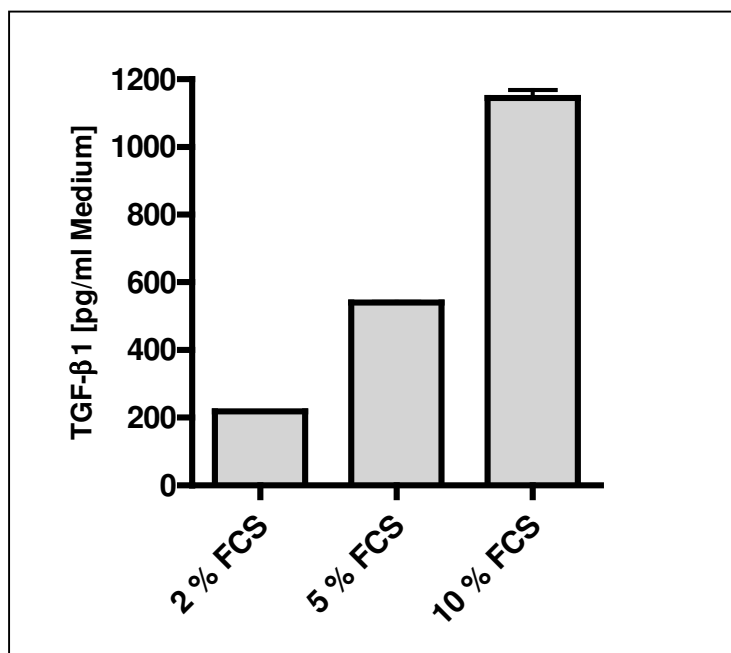


Abb. 11: Proteingehalt an TGF- β 1 in Kulturmedium mit verschiedenen FCS-Anteilen gemessen im ELISA.

Deutlich sichtbar stieg der TGF- β 1-Gehalt entsprechend dem prozentualen Bestandteil an ($n = 3$).

Im weiteren Verlauf sollte die Freisetzung und der Gehalt von TGF- β 1 in eosinophilen Granulozyten aus Darmmukosa untersucht werden. Wie in Abb. 11 dargestellt, wies FCS-haltiges Medium einen erheblichen Anteil an TGF- β 1 auf. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob eine Kultivierung von Eosinophilen ohne FCS möglich ist. Dazu wurden die aus Darmgewebe isolierten Zellen in Medium mit 10 % und ohne Zusatz von FCS aufgenommen. Das Kulturmedium hatte jeweils eine IL-5-Konzentration von 10 ng/ml. An Zellen wurden ungefähr $4 \cdot 10^6$ /ml ausgesät. Insgesamt war die Vitalität der eosinophilen Granulozyten (und der anderen Zellen) nach Kultivierung ohne FCS schlechter als nach FCS-Kultur. Es lagen stärker degranulierte und deformierte eosinophile Granulozyten vor, die auch eine höhere Nekroserate aufzeigten (Abb. 12). Durch die Kultur ohne FCS überlebten ca. 10% weniger Zellen. Jedoch war die Reinheit nach der Aufreinigung mittels MACS-System 30% höher ($n = 1$).

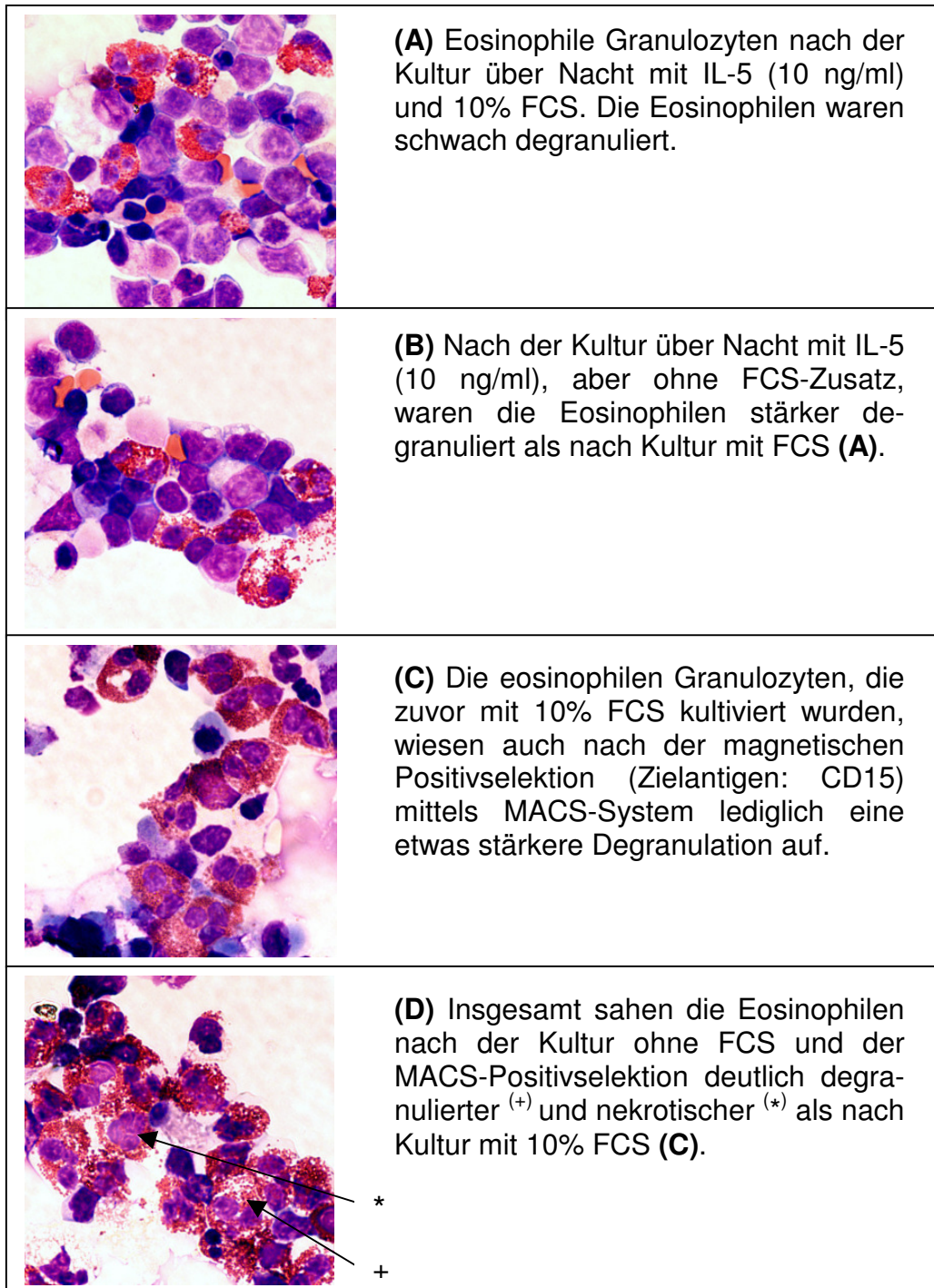


Abb. 12: Vergleich der Kultur intestinaler Eosinophilen mit und ohne FCS.

Das IL-5-haltige (10 ng/ml) Medium hatte keinen oder 10 % FCS-Zusatz. Die Konzentration der ausgesäten Zellen betrug ca. $4 \cdot 10^6$ /ml. Nach der Kultur wurde eine Positivselektion der eosinophilen Granulozyten mit dem MACS-System (Zielantigen: CD15) durchgeführt. Es wurden nach Giemsa/May-Grünwald gefärbte Zytospins differenziert (ohne Erythrozyten) und fotografiert.

3. Ergebnisse

Zur Darstellung des Gehalts an TGF- β 1-Protein in eosinophilen Granulozyten aus Blut und Darmgewebe wurde ein Westernblot durchgeführt (Abb. 13). TGF- β 1 liegt in dem verwendeten Kontrollpeptid als Monomer (12,5 kDA) und als Dimer (25 kDA) vor, wird aber durch die denaturierenden Bedingungen in der SDS-Gelelektrophorese ausschließlich als Monomer darstellbar sein. An TGF- β 1-Protein erfolgte die Auftragung von 500 pg und 2,5 ng. Die eosinophilen Granulozyten aus Blut wurden mit **(A)** Cytochalasin B (5 μ g/ml, 10 min) bzw. mit **(B)** Cytochalasin B (5 μ g/ml, 10 min), IL-5 (10 ng/ml, 60 min) und fMLP (1 μ g/ml, 30 min) in HACM-Puffer bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Es folgte eine Lysierung des Zellpellets in Extraktionspuffer. Die Anzahl der eingesetzten Zellen betrug jeweils $0,32 \cdot 10^6$ Eosinophile. Außerdem wurde intestinale Mukosa homogenisiert, lysiert und zentrifugiert. Davon wurde der Überstand mit ca. 5 μ g Proteinmenge verwendet **(C)**. Das Detektionslimit für das TGF- β 1-Protein lag bei ca. 500 pg.

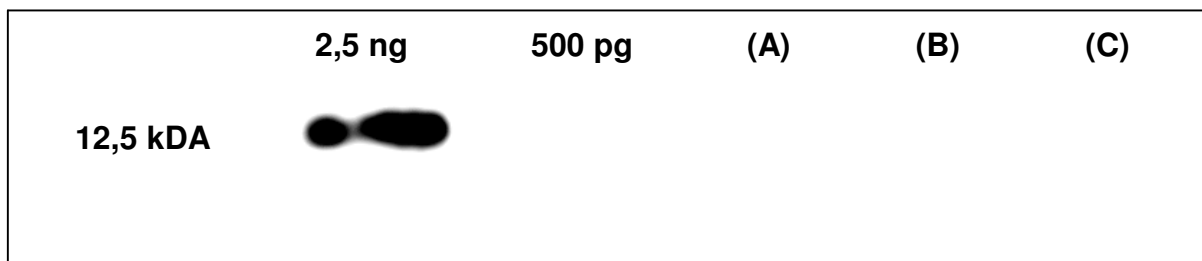


Abb. 13: Mengen von < 500 pg TGF- β 1 waren im Westernblot nicht mehr nachweisbar.

Es konnte der TGF- β 1-Proteingehalt weder in Zellextrakten aus Darmgewebe noch aus eosinophilen Blutgranulozyten dargestellt werden. Die Zellen (je $0,32 \cdot 10^6$ Eosinophile) wurden mit **(A)** Cytochalasin B (5 μ g/ml, 10 min) bzw. **(B)** Cytochalasin B (5 μ g/ml, 10 min), IL-5 (10 ng/ml, 60 min) und fMLP (1 μ g/ml, 30 min) bei 37°C im Wasserbad stimuliert. Danach erfolgte die Zentrifugation und Lysierung der Zellen. **(C)** Aufgetragen wurden 5 μ g Proteine aus dem Überstand von dem homogenisierten und lysierten Darmzellextrakt.

Der Westernblot scheint offensichtlich nicht sensitiv genug zu sein um die TGF- β 1-Konzentrationen in den untersuchten Zellen nachzuweisen. Daher wurde die Proteinmessung mittels des humanen TGF β -1 Immunoassays (Quantikine, R&D Systems GmbH, Wiesbaden) vorgenommen. Die eosinophilen Granulozyten aus Blut und intestinaler Mukosa wurden in HACM-Puffer resuspendiert. Im 37°C warmen Wasserbad erfolgte die Inkubation mit Cytochalasin B (5 μ g/ml, 10 min), IL-5 (10 ng/ml, 90 min) sowie mit fMLP (1 μ g/ml, 30 min). Zusätzlich wurden unstimulierte

Eosinophile untersucht. Zur Bestimmung des Proteingehalts an TGF- β 1 wurden die Zellen zentrifugiert und das Pellet in Wasser lysiert. In den HACM-Überständen und Lysaten der eosinophilen Blutgranulozyten führte die Stimulation zu keinem signifikanten Unterschied. Außerdem bestand keine relevante Differenz beim Vergleich der Überstände mit den Lysaten ($n= 3$, Abb. 14). Bei eosinophilen Granulozyten aus Darmmukosa (56% Reinheit) resultierte die fMLP-Stimulation in einem leichten Anstieg der intrazellulären TGF- β 1-Konzentration ($n = 1$, Abb. 14). Allerdings konnte dieser Versuch aufgrund mangelnder Verfügbarkeit weiterer Darmbiopsien nicht wiederholt werden. Eine andere Untersuchung wies in lysierten Eosinophilen aus Darmgewebe $407,8 \pm 61,7$ pg TGF- β 1/ 10^6 Eosinophile nach ($n = 4$). Jedoch waren die Zellen vorher in Medium mit 10% FCS kultiviert worden. Somit führte die Kultur in FCS-haltigen Medium trotz Zellwaschung zu erhöhten TGF- β 1-Werten .

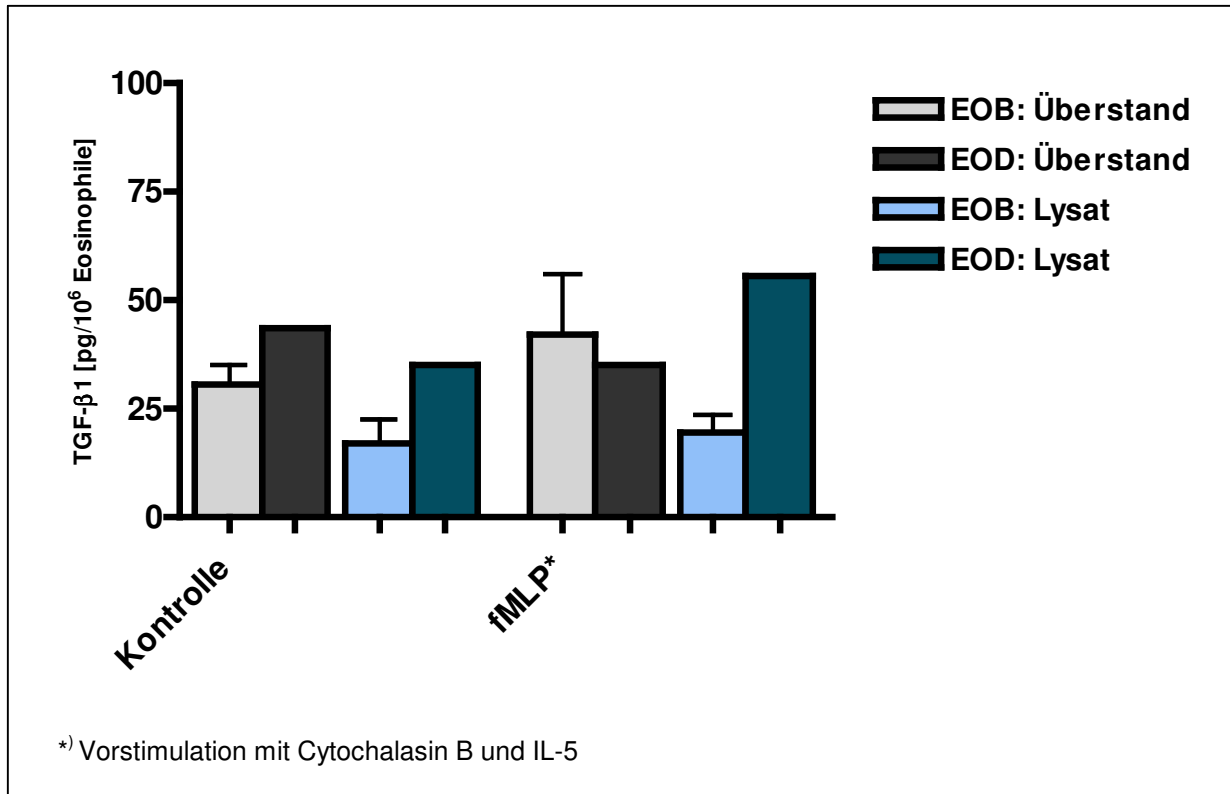


Abb. 14: Die Sekretion von TGF-β1-Protein ließ sich weder in eosinophilen Granulozyten aus Blut (EOB) noch in intestinalen Eosinophilen signifikant induzieren. Intrazelluläres TGF-β1 wird in fMLP-stimulierten Darmeosinophilen exprimiert (EOD).

Es lag kein Unterschied in der nachgewiesenen Menge in den HACM-Überständen verglichen mit der in Wasserlysaten vor (Messung im ELISA). Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C mit folgenden Substanzen inkubiert: Cytochalasin B (5 µg/ml, 10 min), IL-5 (10 ng/ml, 90 min) und fMLP (1 µg/ml, 30 min). Eine nicht-stimulierte Kontrolle wurde zur Ermittlung der TGF-β1 Grundexpression bzw. -sekretion analysiert. Die Ergebnisse wurden mittels ELISA gemessen und sind als Mittelwerte (± Standardabweichung) dargestellt (Bluteosinophile: $n = 3$, Darmeosinophile: $n = 1$).

3.2.5. Expression der TGF-β-mRNA in eosinophilen Granulozyten aus Blut und Darmmukosa mittels Realtime-PCR

Die eosinophilen Granulozyten wurden in HACM-Puffer mit Cytochalasin B (5 µg/ml, 10 min) sowie mit IL-5 (10 ng/ml, 90 min) im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Danach erfolgte die 30-minütige Stimulation mit Ionophor (1 µM) oder fMLP (1 µg/ml). Nach der Sedimentation wurden die Zellpellets mit RLT-Puffer lysiert, die RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Anschließend erfolgte die Analyse der mRNA für TGF-β im Verhältnis zur GAPDH mittels Realtime-PCR. In den eosinophilen Granulozyten aus Blut steigerten Ionophor und fMLP das Verhältnis der Genexpression von TGF-β zur

3. Ergebnisse

GAPDH signifikant auf $0,028 \pm 0,01$ bzw. $0,024 \pm 0,006$ ($n = 3$). In intestinalen Eosinophilen konnte keine signifikante Veränderung des Wertes nach Stimulation detektiert werden. Allerdings wiesen eosinophile Darmgranulozyten eine signifikant höhere TGF- β -Basalexpression verglichen zu nicht-stimulierten Bluteosinophilen auf ($n = 3$, Abb. 15).

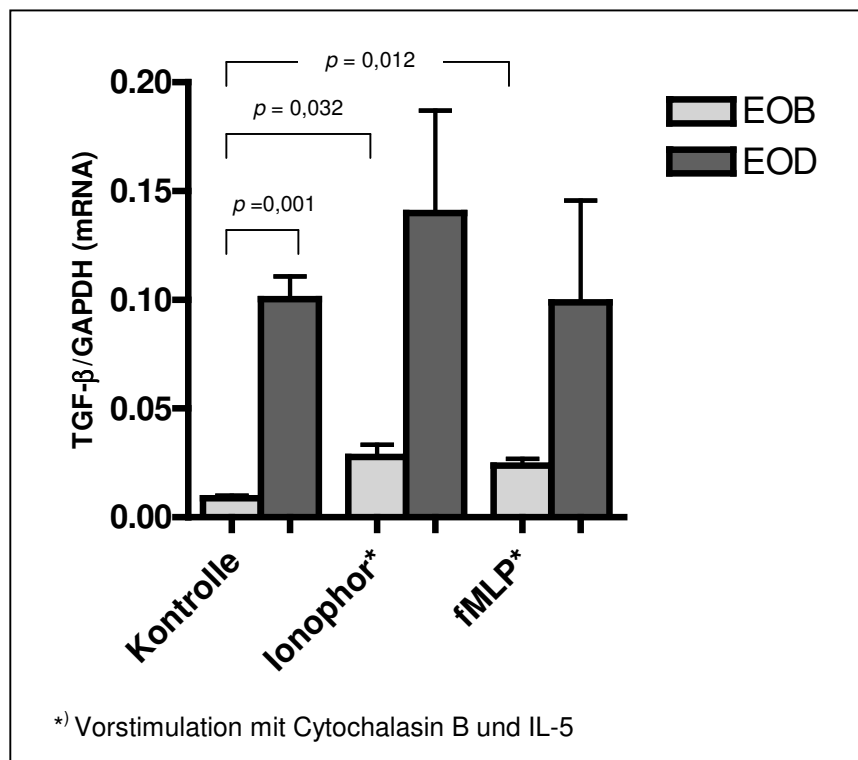


Abb. 15: Ionophor und fMLP erhöhten das Verhältnis der mRNA-Relation von TGF- β -GAPDH signifikant in eosinophilen Granulozyten aus Blut (EOB). Dagegen konnte in eosinophilen Darmgranulozyten (EOD) keine Änderung nachgewiesen werden. Intestinale Eosinophile wiesen einen signifikant höheren Wert in der Kontrollbedingung als Bluteosinophile auf.

Die abgebildeten Daten sind Mittelwerte (\pm Standardabweichung, jeweils $n = 3$), die mittels Realtime-PCR analysiert wurden. Zur Stimulation erfolgte die Inkubation in HACM-Puffer mit Cytochalasin B (5 μ g/ml, 10 min) und IL-5 (10 ng/ml, 90 min) sowie Ionophor (1 μ M) oder fMLP (1 μ g/ml) für jeweils 30 min im 37 °C warmen Wasserbad. Die Kontrollprobe erhielt keinen Zusatz.

3.3. Charakterisierung der eosinophilen Granulozyten aus Blut und Darmmukosa anhand der mRNA-Expression mittels RT-PCR

Die Genexpressionsmuster von Blut-, aber vor allem von Darmeosinophilen sind bis dato nur wenig untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Expressionsmuster der wichtigsten inflammatorischen bzw. antiinflammatorischen Zytokine und Chemokine vergleichend zwischen Blut- und Darmeosinophilen mittels RT-PCR analysiert werden. Bisher ist bekannt, dass humane eosinophile Granulozyten u.a. die Zytokine IL-3, IL-5, IL-13, TNF- α und IFN- γ bilden. Ebenfalls exprimieren diese Zellen die Chemokine IL-8, RANTES, Eotaxin, MCP-1 und MIP-1 α [5;6;11;15;21;41;71].

3.3.1. Differentielle mRNA-Expression von Zytokinen

Die Synthese der mRNA für IL-5 und IL-13 in Blut- und Darmeosinophilen war nur gering. Etwas stärker wurde IL-3 von Bluteosinophilen exprimiert (Abb. 16A). TNF- α war in eosinophilen Granulozyten aus Darmmuskosa deutlich stärker exprimiert als in Eosinophilen aus Blut. Bei IFN- γ war kein Unterschied zwischen den Eosinophilenpopulationen zu beobachten (Abb.16B).

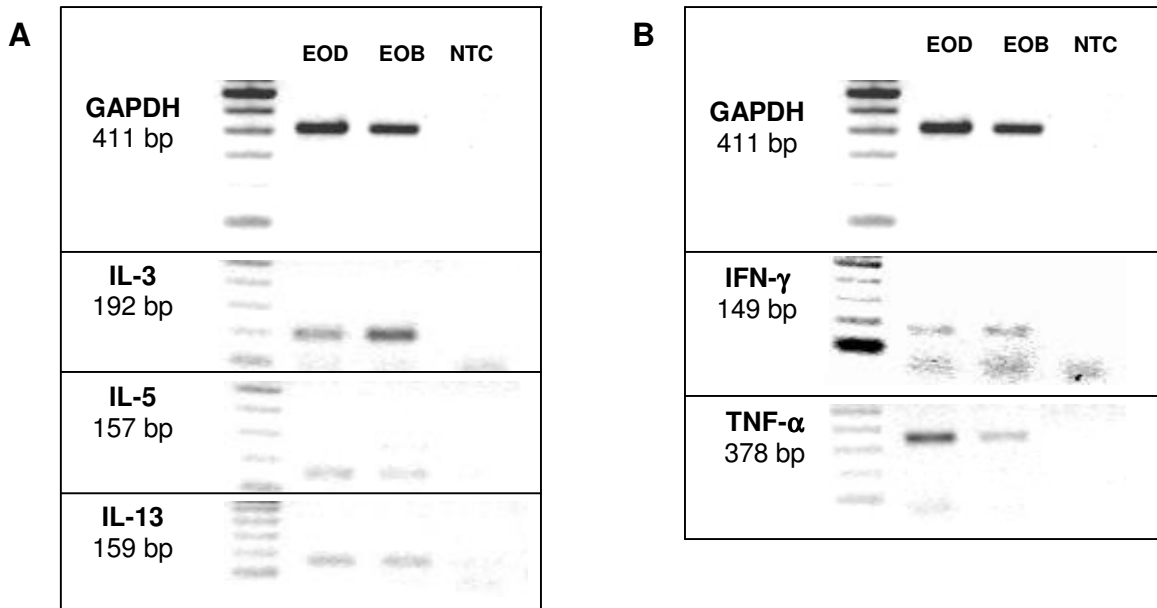


Abb. 16: RT-PCR der mRNA-Expression von verschiedenen Zytokinen mit den entsprechenden Fragmentlängen in eosinophilen Granulozyten aus Blut (EOB) und Darmmukosa (EOD).

Es ließ sich die mRNA für IL-3, IL-5 und IL-13 in beiden Granulozytenpopulationen nachweisen. Dabei bildeten Bluteosinophile etwas mehr IL-3-mRNA und etwas weniger IL-5-mRNA als intestinale Eosinophile (**A**). IFN- γ wurde in eosinophilen Granulozyten aus Blut und Darmmukosa exprimiert. Darmeosinophile synthetisierten höhere Mengen an TNF- α -mRNA (**B**). Nach Isolierung der Gesamt-RNA aus angereicherten Blut- bzw. Darmeosinophilen wurde eine Reverse Transkription vorgenommen. Der Nachweis der Gentranskription erfolgte mit den spezifischen Primerpaaren für GAPDH, IL-3, IL-5 und IL-13 sowie für IFN- γ und TNF- α . Die Anzahl der PCR-Zyklen betrug für GAPDH: 32, für die Interleukine und TNF- α : 38 sowie für IFN- γ : 40. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%tigen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Es ist die Expression der angegebenen Genprodukte im Vergleich zur GAPDH-Synthese gezeigt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer zweimal durchgeführten PCR. NTC: no template control (Nullprobe).

3.3.2. Differentielle mRNA-Expression von Chemokinen

Es ließen sich alle untersuchten Chemokine (MCP-1, MCP-3, MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES) darstellen. Die Expression von MCP-1 und RANTES war bei den Blut-eosinophilen geringfügig stärker. Ansonsten lagen keine Unterschiede zwischen eosinophilen Blut- und Darmgranulozyten vor (Abb. 17A). Eotaxin und Eotaxin-3 sind in beiden Eosinophilenpopulationen nicht, Eotaxin-2 in Eosinophilen aus Blut etwas stärker nachweisbar. IL-8-mRNA wurde dagegen deutlich mehr in eosinophilen Darmgranulozyten detektiert (Abb. 17B).

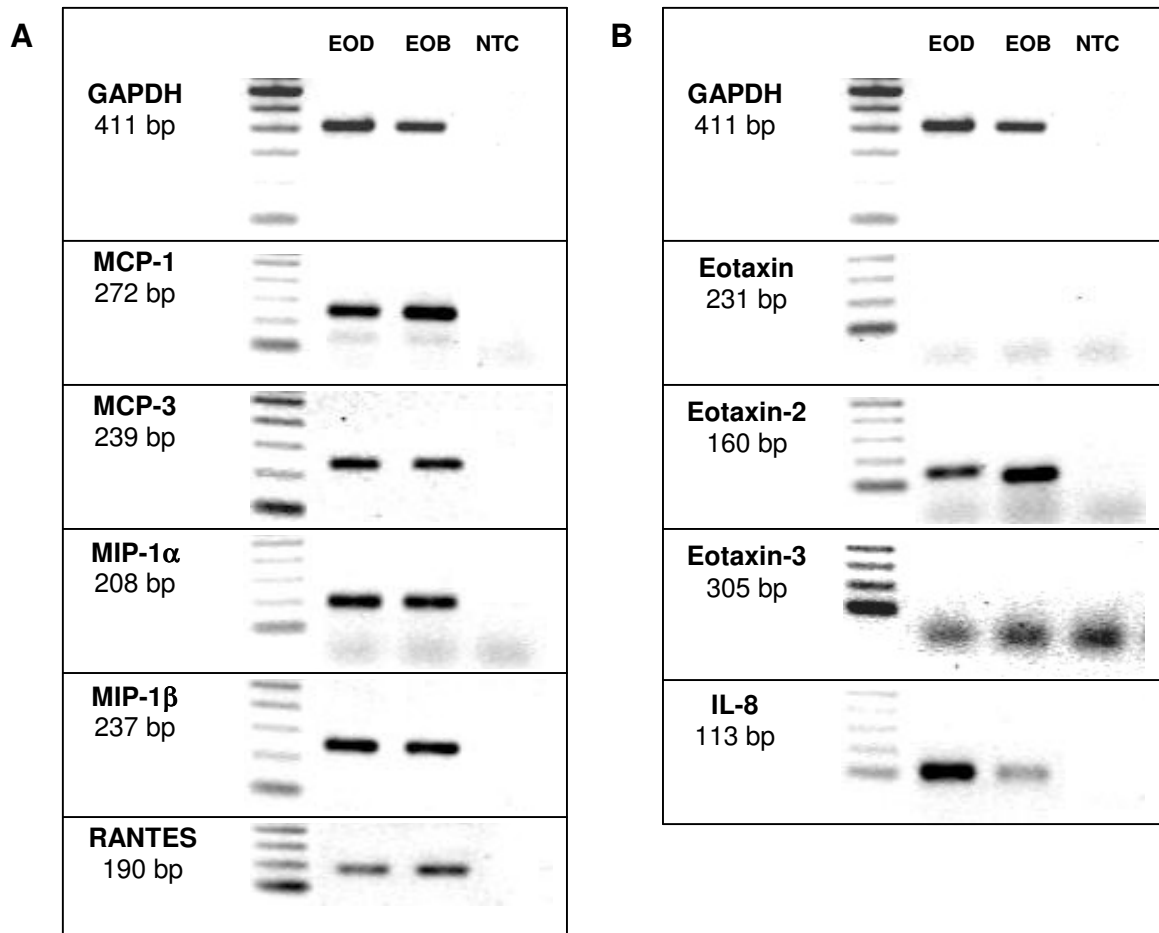


Abb. 17: RT-PCR der Expression von mRNA verschiedener Chemokine mit den entsprechenden Fragmentlängen in eosinophilen Granulozyten aus Blut (EOB) und Darmmukosa (EOD).

Es konnte die Expression aller untersuchten Chemokine belegt werden. Eine leicht erhöhte mRNA-Bildung lag für MCP-1 und RANTES in Bluteosinophilen vor. Die IL-8-mRNA wurde dagegen deutlich stärker von eosinophilen Darmgranulozyten synthetisiert (**A**). In Eosinophilen aus Blut und Darmmukosa wurden Eotaxin und Eotaxin-3 nicht detektiert. Eotaxin-2 wurde in eosinophilen Blutgranulozyten stärker gebildet (**B**). Es wurde eine Reverse Transkription mit der isolierten RNA aus angereicherten Blut- und Darmeosinophilen durchgeführt. Die Analyse der Gentranskription erfolgte mit spezifischen Primerpaaren für GAPDH, MCP-1, MCP-3, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-8 sowie für Eotaxin, Eotaxin-2 und Eotaxin-3. Die Anzahl der Zyklen war in der PCR für GAPDH: 32 und für die Chemokine: 38. Die Auftrennung der PCR-Produkte wurde auf einem 1%tigen Agarosegel, das Ethidiumbromid enthielt, vorgenommen. Die Expression der angegebenen Genprodukte wird vergleichend zur GAPDH-Bildung dargestellt. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus einer zweimal durchgeführten PCR gezeigt. NTC: no template control (Nullprobe).

4. Diskussion

4.1. Isolation und Anreicherung von eosinophilen Granulozyten aus Blut und Darmmukosa

Es gibt viele Daten über die Morphologie, Differenzierung und Biochemie der eosinophilen Granulozyten. Auch die Einwanderung der Zellen ins periphere Blut und Gewebe ist untersucht worden [15]. Viele pathophysiologische Daten wurden aber in Tiermodellen generiert, die nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar sind [13]. Humane Daten wurden vornehmlich an eosinophilen Granulozyten von Spendern mit Eosinophilie erhoben. Die Eosinophilen von gesunden und erkrankten Spendern unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Morphologie und den funktionellen Eigenschaften [34]. Den Kenntnissen über gastrointestinale eosinophile Granulozyten liegen hauptsächlich in vitro Studien allergischer Erkrankungen des Respirationstrakts zugrunde [7]. Anscheinend besteht aber eine Korrelation in Bezug auf die Hypersensibilität im Respirations- und Gastrointestinaltrakt [7;29]. Um intestinale Eosinophile mit denen aus Blut vergleichen zu können, sollte eine Methode zur Isolation dieser Zellen aus intestinalem Gewebe etabliert werden. Um für Bluteosinophile eine geeignete Isolationsmethode zu finden, werden zwei publizierte Techniken verglichen. So wurden humane eosinophile Granulozyten aus peripherem venösen Blut von gesunden Spendern mit der Durchführung einer Dextran-Sedimentation, einem Ficoll-Dichtezentrifugation, einer Erythrozytenlyse, einem bzw. keinem Percoll-Dichtezentrifugation sowie einer magnetischen Negativselektion mittels MACS-System (Zielantigen: CD16) isoliert und angereichert. Der Vergleich der Isolation mit bzw. ohne Percoll-Dichtezentrifugation ergibt eine Reinheit von durchschnittlich jeweils 93% eosinophile Granulozyten. Kontaminierende Zellen sind dabei vornehmlich neutrophile Granulozyten und Lymphozyten. Die Vorteile des Wegfalls der Percoll-Dichtezentrifugation liegen in der höheren Zellausbeute und der Verkürzung der Aufreinigungsdauer. Somit ist die Durchführung der Percoll-Dichtezentrifugation, wie bei Takafuji, Bischoff et al. [34] beschrieben, nicht notwendig. Elovic et al. erzielen bei Anwendung des hier dargestellten Protokolls ohne die Percoll-Dichtezentrifugation 95 – 99% reine eosinophile Granulozyten [40]. Der Unterschied zwischen der hier erreichten Reinheiten und denen von Elovic et al. könnte mit den einzelnen Abwandlungen der Protokolle, wie verschiedene Inkubationszeiten der Microbeads, begründet werden. Weiterhin wurde eine Methode zur Isolation und Aufreinigung von

humanen eosinophilen Granulozyten aus intestinaler Mukosa etabliert, die aus einem enzymatisch-mechanischem Gewebsverdau, einer Kultivierung über Nacht und anschließender magnetischer Positivseparation mittels MACS-System (Zielantigen: CD15) besteht. Die durchschnittlich erzielte Reinheit liegt bei ungefähr 78%, in Einzelfällen sogar bei 80 – 90% intestinale Gewebseosinophile. Kontaminierende Zellen sind Epithel- und Endothelzellen sowie andere Zellen der Darmmukosa. Da eine unspezifische Bindung von MACS-Beads an tote Zellen vorliegt, verunreinigen diese Zellen zusätzlich die Eosinophilenfraktion. Die gesamte Methode ist jedoch ein aufwendiges und schwieriges Verfahren. Zum einen sind die isolierten Einzelzellsuspensionen trotz sterilem Arbeitens stets durch die physiologische Darmflora mikrobiell kontaminiert. Deswegen werden dem Kulturmedium immer gut wirksame Antibiotika beigefügt. Zum anderen beeinflusst der Mukosaschleim die Isolation sowie die Kultur der Zellen. Als Vorlage für die hier etablierte Isolationstechnik diente die von Bischoff et al. [72] verwendete Methode der Aufreinigung der Darmmastzellen. Diese Darmmastzellaufreinigung basiert ebenfalls auf dem mechanisch-enzymatischen Verdau von Darmmukosa und anschließender Kultur über Nacht und magnetischer Zellseparation. Nach der Isolierung wird eine mehrwöchige Kultur durchgeführt, die Reinheiten von 98 –100% Mastzellen ergibt [72]. Da die eosinophilen Granulozyten laut unseren Ergebnissen in Kultur, trotz Zusatz von IL-5 oder anderen Wachstumsfaktoren, nur ein bis wenige Tage überleben (Daten nicht gezeigt), bietet sich die mehrwöchige Kultur nicht an. Lorentz et al. erreichen eine Anreicherung der eosinophilen Granulozyten aus der Einzelzellsuspension von durchschnittlich 51% mittels magnetischer Negativselektion (Zielantigene CD3, CD14, CD16, CD19 und CD117) [73]. Im Vergleich dazu ist die in dieser Arbeit verwendete magnetische Positivselektion (Zielantigen: CD15) eine bessere Alternative, da höhere Reinheiten von durchschnittlich 78% eosinophile Granulozyten resultieren. Dagegen ist es vergleichsweise einfach Eosinophile in einer hohen Reinheit und Anzahl aus dem Blut zu isolieren. Einerseits müssen die Bluteosinophilen nicht aus einem Gewebsverband gelöst werden. Andererseits sind weniger potentiell kontaminierende Zellen im Blut enthalten. Nicht zuletzt sind Bluteosinophile wesentlich schneller aufgereinigt und es sind keine mechanisch-enzymatischen Verdau-schritte notwendig. Dies wäre eine Begründung dafür, dass eosinophile Granulozyten aus Blut ihre lichtmikroskopische Morphologie im Verlauf der Anreicherungs Vorgangs nicht wesentlich ändern. Bei der Betrachtung der eosinophilen Granulozyten aus

Darmmukosa nach dem mechanisch-enzymatischem Verdau sind morphologische Unterschiede im Vergleich zu den Bluteosinophilen sichtbar. So haben die Zellen weniger Granula, teilweise Vakuolen und sind unregelmäßiger begrenzt. Außerdem lassen sich die Darmeosinophilen weniger leuchtend anfärben. Diese Anzeichen der geringeren Vitalität verstärken sich nach der Kultivierung über Nacht. Ein Vorteil der Isolation der Blutzellen ist auch, dass problemlos größere Mengen an eosinophilen Granulozyten gewonnen werden können, indem entsprechende Blutmengen verarbeitet werden. Die intestinale Mukosa stammt von Darmpräparaten, die aus therapeutischer Notwendigkeit von Patienten entnommen werden mussten. Deswegen kann die Größe der Darmbiopsien nicht willkürlich bestimmt und damit die Ausbeute der Zellen variiert werden. Es ist unbekannt, wie viele Zellen während des enzymatisch-mechanischen Verdau verloren gehen. Der Zellverlust der intestinalen Eosinophilen ist aber während der Aufreinigung höher als bei Bluteosinophilen. Dabei sterben während der Kultivierung über Nacht die meisten Zellen ab. Es ist wenig wahrscheinlich, dass die isolierten Bluteosinophilen, aber besonders die isolierten Darmeosinophilen in Bezug auf physiologische Charakteristika den Eosinophilen im Blut bzw. Gewebe entsprechen. Jegliche Manipulation und Entfernung der Zelle aus ihrer physiologischen Umgebung hat Auswirkungen auf den Zustand der Zelle. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aufreinigungsmethode die Zellen schädigt und deren Zustand, vornehmlich in Hinblick auf die Aktivierbarkeit, maßgeblich beeinflusst. Auch Strukturen wie Rezeptoren der Zelloberfläche können beschädigt oder während der Isolation intestinaler eosinophiler Granulozyten sogar verdaut werden. Eine Folge ist, dass die Zellen nicht mehr auf Mediatoren reagieren können. So ist die Freisetzung von Mediatoren direkt nach der Isolierung von Mastzellen auf physiologische Stimuli auf ein Minimum reduziert. Nach 1-wöchiger Kultur kann aber ein deutlicher Anstieg der Reaktivität beobachtet und damit eine Regeneration der Zellen angenommen werden [74]. Dies könnte auch bei Eosinophilen der Fall sein, da trotz der Zugabe von Wachstumsfaktoren relativ viele Zellen während der Kultur über Nacht absterben. Auch die höhere Reinheit der Zellen mittels magnetischer Zellseparation nach Kultur über Nacht könnte durch fehlende Expression der Zielantigene begründet werden. Wahrscheinlich würden die Zellen nach längerer Kultur den physiologischen Eosinophilen am ehesten entsprechen. So verlängerte die Kokultur mit bovinen Endothelzellen nicht nur die Lebensdauer der Eosinophilen, sondern auch die Morphologie und Effektorfunktion. Die nach der Kultur hypodensen

eosinophilen Granulozyten sezernieren größere Mediatormengen und sind effektiver bei der Bekämpfung von Parasiten als unkultivierte Eosinophile. Ein ähnliches Muster in Bezug auf die Dichte, die Mediatorfreisetzung und der antihelmithischen Wirkung weisen Eosinophile aus Blut bei Allergie und anderen Erkrankungen auf [75].

4.2. Vergleich der Mediatorexpression und -Freisetzung aus humanen eosinophilen Granulozyten aus Blut und Darmmukosa

4.2.1. Regulation der Freisetzung von ECP und LTC₄

Intestinale eosinophile Granulozyten sezernieren unstimuliert höhere Proteinmengen an ECP als Bluteosinophile. Die ECP-Freisetzung wird in Bluteosinophilen durch Cytochalasin B, IL-5 und fMLP, aber nicht durch Cytochalasin B, IL-5 und Ionophor gesteigert. Darmeosinophile lassen sich dagegen nicht stimulieren. Im Gegensatz dazu setzen Blut- und Darmeosinophilen LTC₄-Protein basal in gleichen Mengen frei. Auffällig ist, dass die Ausschüttung von LTC₄, welches nach Aktivierung neu synthetisiert wird, durch Cytochalasin B und IL-5 und Ionophor und noch deutlicher durch Cytochalasin B, IL-5 und fMLP in beiden Eosinophilenpopulationen in etwa gleich hohen Mengen induziert wird (Abb. 18). Die Unterschiede in der ECP-Freisetzung könnten damit begründet werden, dass die eosinophilen Granulozyten verschiedener Herkunft sind. So stammt die Zellpopulation aus Blut von gesunden Spendern, während die anderen Zellen aus intestinalem Gewebe von erkrankten Spendern isoliert wurden. Es ist wahrscheinlich, dass im Gewebe andere Bedingungen, insbesondere unter pathologischen Umständen, als im Blut vorliegen. Eine mögliche Begründung für die nicht darstellbare Stimulierbarkeit der ECP-Ausschüttung intestinaler eosinophiler Granulozyten könnte auch eine Degranulation und/oder Zellschädigung während der Isolation sein. Auch eine Desensibilisierung nach Aktivierung der Eosinophilen im Gewebe wäre denkbar. So sind eosinophile Granulozyten primär inaktive Zellen, die „primende“ Substanzen wie IL-5, IL-3 oder GM-CSF benötigen, um durch andere Stimuli aktiviert werden zu können [11;34;76]. Diese Substanzen kommen ebenfalls im Gewebe vor, wo sie auch aktivierend wirken können [40]. Bei Erkrankungen, die mit Blut- und Gewebseosinophilie einhergehen, werden in intestinalen Biopsien erhöhte Konzentration an Wachstumsfaktoren (IL-3, IL-5, GM-CSF) sowie des Chemokins Eotaxin gemessen [77]. Es ist nicht auszu-

schließen, dass auch eine Desensibilisierung der Gewebseosinophilen in Bezug auf die LTC₄-Synthese vorliegt. Denn intestinale eosinophile Granulozyten könnten in ihrer physiologische Umgebung wesentlich mehr Leukotriene synthetisieren und freisetzen wie hier in vitro dargestellt. Zusätzlich könnte auch in diesem Fall eine isolationsbedingte Einschränkung der Synthese- bzw. Sekretionsfähigkeit vorhanden sein. So sezernieren isolierte eosinophile Blutgranulozyten nach mindestens 14-tägiger Kokultur mit bovinen Endothelzellen nach Zusatz von Ionophor 3-fach höhere LTC₄-Mengen als unkultivierte Eosinophile. Dieses Ergebnis zeigt sich auch nach mindestens 7-tägiger Kokultur der Eosinophilen in Medium, das von bovinen oder humanen Endothelzellen stammt [75]. Eosinophile Granulozyten aus Blut setzen LTC₄ auch nach der Stimulation mit Ionophor oder fMLP, jeweils in Kombination mit „primenden“ Substanzen, frei [34;35]. Dieses kann ebenfalls in den hier diskutierten Resultaten gezeigt werden, denn die Eosinophilen steigern die sezernierte LTC₄-Konzentration durch Cytochalasin B, IL-5 und Ionophor bzw. Cytochalasin B, IL-5 und fMLP. In Bezug auf die ECP-Freisetzung ist bekannt, dass Eosinophile nach dem Zusatz „primender“ Substanzen und fMLP die Freisetzung erhöhen [28;35]. Dieses Ergebnis kann auch hier gezeigt werden, denn Cytochalasin B, IL-5 und fMLP induzieren die Erhöhung der ECP-Ausschüttung. Im Gegensatz dazu erhöht in eosinophilen Granulozyten aus Blut von Asthmatikern Ionophor stärker als fMLP die sezernierte ECP-Menge. Außerdem induziert nur Ionophor, aber nicht fMLP die Zunahme der freigesetzten LTC₄-Konzentration aus diesen Zellen [33]. Mit diesen in Bezug auf Blutzellen von Asthmatikern generierten Daten ist aber kein Vergleich mit den Zellen der vorliegenden Arbeit, die von gesunden Blutspendern stammen, möglich. Denn es sind im Blut von asthmatischen Patienten die Wachstumsfaktoren IL-5, IL-3 und GM-CSF nachweisbar [11], die diese Zellen schon im Organismus „primen“ könnten.

4.2.2. TGF- β -Expression und -Freisetzung

In immunhistochemischen Untersuchungen sind 90% der intestinalen TGF- β 1-positiven Zellen eosinophile Granulozyten, unabhängig davon, ob pathologisches oder nicht-pathologisches Darmgewebe vorliegt. Außerdem steigt die Anzahl der Zellen, die immunhistochemisch für TGF- β 1 reaktiv sind, im pathologischen Gewebe an [57;58]. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit die Expression und

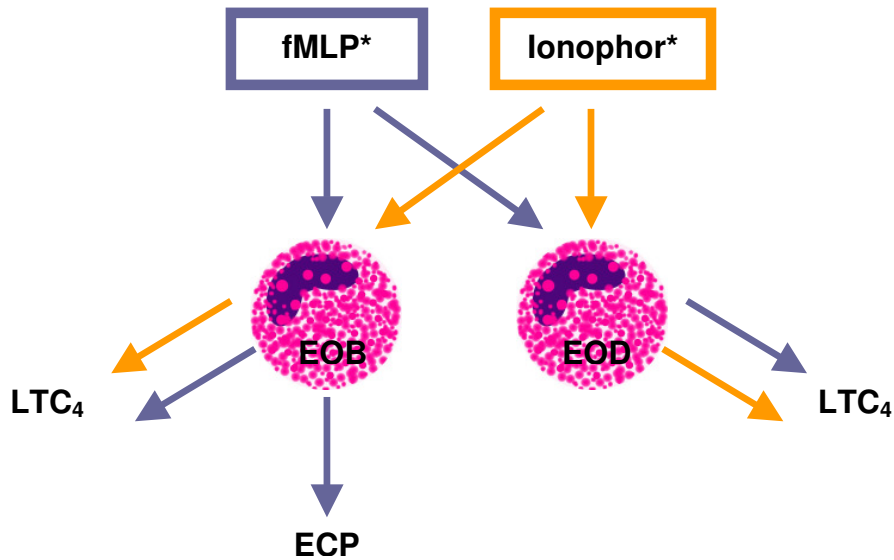
Freisetzung von TGF- β 1 in eosinophilen Granulozyten aus intestinaler Mukosa und Blut untersucht und untereinander verglichen. Die Analyse der TGF- β 1-Expression erfolgte zunächst im Westernblot. Jedoch war die Sensitivität des Westernblots zu gering um TGF- β 1-Protein in Zellextrakten aus intestinaler Mukosa sowie aus eosinophilen Granulozyten des Blutes nachweisen zu können. In der Literatur werden die eosinophilen Granulozyten vornehmlich mit anderen Methoden analysiert. Insbesondere der TGF- β 1-ELISA scheint dabei eine sinnvolle Alternative zum Westernblot zu sein. Die intestinalen Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit für die Analyse im ELISA zur Kultivierung über Nacht in Medium ohne FCS ausgesät, um den Einfluss des im FCS enthaltenem TGF- β 1-Proteins auszuschließen. Beim Vergleich der Kultivierung ohne und mit FCS-Zusatz zeigt sich, dass die Vitalität von FCS-frei kultivierten Zellen deutlich abnimmt. Die beiden Kulturformen sind in Bezug auf eosinophile Granulozyten in der Literatur noch nicht verglichen worden und es bedarf weiterer Experimente, um die Methodik hinsichtlich der Vitalität der Eosinophilen zu optimieren. In dieser Arbeit kann aber keine signifikante Aktivierbarkeit der TGF- β 1-Ausschüttung in eosinophilen Granulozyten aus Blut bzw. Darm gezeigt werden. Ebenso sind keine signifikanten Unterschiede zwischen intestinalen und Bluteosinophilen in Bezug auf die intrazellulären TGF- β 1-Konzentrationen nachzuweisen. Dies trifft sowohl auf unstimulierte als auch auf mit Cytochalasin B, IL-5 und fMLP stimulierte Zellen zu. Anscheinend ist auch die hier dargestellte ELISA-Analyse nicht ausreichend sensitiv, um die TGF- β 1-Expression und -Freisetzung in eosinophilen Granulozyten zu untersuchen. Eine sensitive Methode für die Analyse der mRNA-Expression stellt die quantitative PCR (Realtime-PCR) dar. Mit dieser Analyse-methode kann hier gezeigt werden, dass eosinophile Granulozyten der intestinalen Mukosa eine größere basale TGF- β 1-mRNA-Expression als diese Zellen aus Blut aufweisen. Außerdem erhöhen Ionophor und fMLP, jeweils nach dem Zusatz der „primenden“ Substanzen Cytochalasin B und IL-5, signifikant die mRNA-Synthese für TGF- β 1 in Bluteosinophilen. Im Gegensatz dazu ändert die Stimulation der intestinalen Eosinophilen mit diesen Substanzen die TGF- β 1-Expression nicht. Der Grund dafür könnte sein, dass die Zellen im Gewebe schon aktiviert und/oder desensibilisiert worden sind. Ebenso muss auch wieder die Anreicherungs-methode erwähnt werden, welche die Zellen beeinflusst und sogar schädigen kann. Die höher exprimierte mRNA für TGF- β 1 in intestinalen Gewebseosinophilen im Vergleich zu diesen Zellen aus Blut könnte damit begründet werden, dass die Darmzellen aus

makroskopisch unauffälligem Gewebe von kranken Spendern und nicht wie die anderen Zellen aus Blut von gesunden Spendern stammen. So könnten die pathologischen Bedingungen die Darneosinophilen aktiviert und dadurch die Erhöhung der TGF- β 1-Synthese bewirkt haben. Über die Stimulierbarkeit der mRNA-Expression für TGF- β 1 in intestinalen eosinophilen Granulozyten ist nur wenig bekannt. Mittels in situ Hybridisation ist in Mukosabiopsien bei kollagener Kolitis eine gesteigerte Expression der TGF- β 1-mRNA im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nachweisbar [58]. Diese Referenz kann aber nicht mit den hier erzielten Ergebnissen verglichen werden. Erstens werden in den dargestellten Ergebnissen isolierte intestinale Zellen verwendet und zweitens handelt es sich in den veröffentlichten Daten um Biopsien, die aus gesundem und pathologischem Gewebe stammen. In dieser Arbeit sind die Zellen aber nur aus makroskopisch unauffälligem Material von kranken Patienten isoliert und dann stimuliert worden. Es konnten keine entsprechenden Gewebsmengen von gesunden Spendern verarbeitet werden, da nur Gewebe zur Verfügung stand, das aus therapeutischer Notwendigkeit entfernt werden musste. In der diskutierten Arbeit zeigt sich eine gesteigerte Induktion der TGF- β 1-mRNA in Bluteosinophilen nach Zugabe von Cytochalasin B, IL-5 und Ionophor oder Cytochalasin B, IL-5 und fMLP. Diese erhöhte Expression könnte mit dem im Versuch enthaltenden IL-5 begründet werden, da Elovic et al. zeigen konnten, dass IL-5 neben IL-3 und IL-4 eine Aktivierung der TGF- β 1-Synthese bewirkt [40].

4.3. Vergleich der mRNA-Expression von Zytokinen und Chemokinen

In der vorliegenden Arbeit ist die mRNA-Expression der Zytokine IL-3, IL-5, IL-13 und IFN- γ mittels RT-PCR in unstimulierten Blut- bzw. Darneosinophilen nachweisbar. Zusätzlich exprimieren diese Zellen die Chemokine MCP-1, MCP-3, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES sowie Eotaxin-2. Dagegen lässt sich die mRNA-Expression für Eotaxin und Eotaxin-3 in intestinalen und Bluteosinophilen nicht darstellen. Die Expressionsstärke der analysierten Gene ist bei den miteinander verglichenen Eosinophilenpopulationen meist gleich. In intestinalen eosinophilen Granulozyten wird aber in Bezug auf die GAPDH-mRNA deutlich mehr mRNA für TNF- α und IL-8 als in Bluteosinophilen exprimiert. Warum nun aber vornehmlich in Bezug auf IL-8 und TNF- α ein deutlicher Unterschied vorliegt, ist unklar. Auch in diesem Fall wäre die verschiedene

Herkunft der Zellen eine Begründung. So stammen die intestinalen Eosinophilen aus Gewebe kranker Patienten, während die eosinophilen Granulozyten aus Blut von gesunden Spendern isoliert wurden. Es sind Mediatoren wie IL-5, GM-CSF oder IgA beschrieben worden, welche die Aktivierung der TNF- α - und IL-8-Synthese in Bluteosinophilen induzieren [11;78]. Diese Stimuli könnten auch im Gewebe der kranken Spender die Stimulation der Eosinophilen bewirkt haben. Jedoch ist die Quantifizierung der Expression in der RT-PCR nur bedingt möglich. Um genauere Aussagen treffen zu können, müssten auch in diesem Fall weitere Experimente folgen. In der Literatur ist nur eine Gegenüberstellung von intestinalen eosinophilen Granulozyten in Gewebsbiopsien mit Bluteosinophilen mittels der Immunfluoreszenz- und Immunoassayanalyse beschrieben worden [79]. Dies ist aber nicht mit den hier diskutierten Ergebnissen der isolierten Gewebszellen vergleichbar, da in der Publikation Biopsien den Blutzellen gegenüber gestellt werden. Die anderen publizierten Daten über die Expression der in dieser Arbeit analysierten Gene sind widersprüchlich. Einerseits ist der Expressionsnachweis dieser Gene bis auf MCP-3 und MIP-1 β häufig veröffentlicht worden, ohne jedoch genau zu differenzieren, woher die Zellen stammen und mit welcher Methode die Expression der Gene analysiert wurde [5;6;11;15;21;41;71]. Aus diesem Grund sind diese Daten nur bedingt mit den hier erhobenen Ergebnissen vergleichbar. Andererseits ist aber in Bluteosinophilen von gesunden Spendern die Expression von IL-3, TNF- α , IL-8 und RANTES erst nach Aktivierung messbar [78]. Die mRNA für IL-5 oder IFN- γ kann in diesen un- bzw. stimulierten eosinophilen Granulozyten nicht detektiert werden [78]. In der vorliegenden Arbeit sind aber die Expressionen dieser mRNAs auch in unstimulierten Bluteosinophilen nachweisbar. Die Abweichung könnte darin begründet sein, dass für die Analysen in der Publikation andere Blutspender als für diese Arbeit vorliegen. Eine andere Erklärung wären unterschiedliche Arbeitsprotokolle und Substanzen. Im Gegensatz dazu wird über die Eotaxin-Expression nur allgemein gesprochen [6;11;21;41;71]. Es geht nicht hervor, ob Eotaxin-2 und Eotaxin-3 auch analysiert wurden. Die hier genauer durchgeführte Qualifizierung ergibt, dass nur die Expression von Eotaxin-2 in beiden Eosinophilenpopulationen nachweisbar ist. Auch ein direkter Nachweis von MCP-3-mRNA in eosinophilen Granulozyten ist bis dato noch nicht erfolgt. Das Chemokin wird aber teilweise in Entzündungszellen des Respirationstrakts synthetisiert [80]. Die Expression von MIP-1 β ist bis dato nur in eosinophilen Granulozyten von Mäusen beschrieben worden [81].



⁷⁾ Priming mit Cytochalasin B und IL-5

Abb. 18: Aktivierbarkeit der isolierten eosinophilen Granulozyten aus peripherem venösen Blut (EOB) und Darmmukosa (EOD) mit Cytochalasin B, IL-5 und Ionophor/fMLP in Bezug auf die Freisetzung von ECP und LTC₄.

Die Stimulation der Bluteosinophilen mit Cytochalasin B, IL-5 und fMLP erzielt eine gesteigerte Sezernierung des gespeicherten Mediators ECP. Zur erhöhten Sekretion des Mediators LTC₄, das de novo synthetisiert wird, führt die Zugabe von Cytochalasin B, IL-5 und Ionophor/fMLP. Die Inkubation der Darmeosinophilen mit Cytochalasin B, IL-5 und Ionophor/fMLP steigert nur die LTC₄-Sekretion. Die Erhöhung der ECP-Freisetzung ist aus intestinalen Eosinophilen mit diesen Stimuli nicht möglich.

4.4. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten Ergebnisse generiert werden, welche die unterschiedliche in vitro Stimulierbarkeit von eosinophilen Granulozyten aus peripherem Blut und intestinalem Mukosagewebe zeigen. Es handelt sich aber um isolierte Zellen, die aus ihrem physiologischen Umfeld entfernt und einer aufwendigen Isolationsprozedur unterzogen wurden. Es ist unklar, ob die Stimuli Cytochalasin B, IL-5 und Ionophor oder fMLP in vivo die gleiche Wirkung wie in vitro haben. Daher sollten Daten generiert werden, die auf Experimenten beruhen, die eher einer in vivo Situation entsprechen. So könnten die Zellen direkt in vivo untersucht werden, welches jedoch schwierig zu verwirklichen ist. Eine andere Möglichkeit wäre die Kokultivierung von eosinophilen Granulozyten mit anderen Zellen. Unter 4.2.1. wird die Kokultur von Bluteosinophilen mit bovinen Endothelzellen genannt, die sich positiv auf die Vitalität und Funktionalität der Eosinophilen auswirkt [75]. Weitere Zellen, die dafür in Frage kämen, wären T-Zellen und Mastzellen. Bisherige Analysen der Interaktion dieser Zellen (vornehmlich in vitro) zeigen, dass eosinophile Granulozyten die T-Zellen durch die Sezernierung bestimmter Zytokine und die Präsentation von Antigenen regulieren können. Andererseits akkumulieren Eosinophile bei Interaktion mit Antigenen, wenn chemotaktische Substanzen wie IL-5 durch Th2-Zellen freigesetzt werden [7]. Auch die Mastzellmediatoren können ein wichtiger Regulator der Gewebseosinophilen sein. Die Mastzellen sezernieren nach Aktivierung verschiedene Mediatoren (z.B. Zytokine, Chemokine, Histamin oder Lipidmediatoren), die auf eosinophile Granulozyten chemotaktisch wirken und/oder an der Aktivierung und Apoptosehemmung dieser Zellen beteiligt sind [17;82]. Eosinophile setzen wiederum Mediatoren wie SCF oder NGF frei, die auf Mastzellen wirken können [15;17]. Mit der Erhebung weiterer Daten könnten wichtige Erkenntnisse über die Pathogenese der vielen Eosinophilen-assoziierten Krankheiten, insbesondere des Gastrointestinaltrakts, erhoben werden. Dadurch könnte die Basis für die Generierung neuer Therapiestrategien gebildet werden.

5. Zusammenfassung

Eosinophile Granulozyten exprimieren und sezernieren viele verschiedene Mediatoren, wodurch die Zellen ein wichtiger Bestandteil von diversen physiologischen und pathophysiologischen Reaktionen sind. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden zur Anreicherung von humanen eosinophilen Granulozyten aus peripherem venösen Blut mit und ohne Percoll-Dichtezentrifugation verglichen. Die eosinophilen Granulozyten wurden dabei zunächst mittels einer Dextran-Sedimentation, Ficoll-Dichtezentrifugation und Erythrozytenlyse isoliert. Entweder direkt im Anschluss oder nach einer Percoll-Dichtezentrifugation folgte eine magnetische Negativseparation (Zielantigen: CD16). Ohne den Percoll-Zwischenschritt ergab sich eine höhere Zellausbeute bei einer verkürzten Arbeitsdauer und gleicher Reinheit von durchschnittlich 93% im Vergleich zur Isolation mit der Percoll-Dichtezentrifugation. Außerdem wurde eine neue Methode zur Gewinnung von humanen eosinophilen Gewebsgranulozyten aus Darmmukosa etabliert. Nach der enzymatisch-mechanischen Isolation der Zellen aus intestinaler Mukosa erfolgte eine Kultur über Nacht mit anschließender magnetischer Positivseparation (Zielantigen: CD15). Der erreichte Reinheitsgrad betrug durchschnittlich 78% eosinophile Granulozyten, jedoch war die Vitalität dieser isolierten Zellen geringer als bei Bluteosinophilen. Der Vergleich der isolierten eosinophilen Granulozyten aus Blut und Darm zeigte Unterschiede in der basalen Mediatorexpression und -Freisetzung sowie der Aktivierbarkeit. Der Zusatz von Cytochalasin B, IL-5 und fMLP induzierte signifikant die ECP-Ausschüttung aus eosinophilen Blutgranulozyten. Intestinale Eosinophile setzen durch die verwendeten Substanzen keine erhöhten Mengen an präformiertem ECP frei, wiesen aber eine deutlich höhere Basalfreisetzung an ECP als Bluteosinophile auf. Dagegen bewirkte Cytochalasin B, IL-5 und Ionophor und noch deutlicher Cytochalasin B, IL-5 und fMLP die Induktion der Sekretion von de novo synthetisiertem LTC₄ sowohl in eosinophilen Granulozyten aus Blut als auch aus Darmmukosa. Beide Eosinophilenpopulationen setzten ungefähr gleich hohe LTC₄-Level sowohl basal als auch nach Stimulation frei. Auf mRNA-Ebene ließ sich die Expression von TGF-β1 in eosinophilen Granulozyten aus Blut durch Cytochalasin B, IL-5 und Ionophor bzw. Cytochalasin B, IL-5 und fMLP signifikant erhöhen. Intestinale Eosinophile konnten durch diese Stimuli nicht aktiviert werden, wiesen jedoch eine höhere basale TGF-β1-Expression verglichen mit Bluteosinophilen auf. Zusätzlich wurde die

Expression verschiedener Zytokine und Chemokine untersucht. Beide Populationen der Eosinophilen exprimierten die mRNA für die Zytokine IL-3, IL-5, IL-13, IFN- γ und TNF- α . Auch die mRNA der Chemokine MCP-1, MCP-3, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8 sowie Eotaxin-2 sind in Eosinophilen aus Blut und Darmmukosa darstellbar. Die mRNA-Expression für TNF- α und IL-8 war deutlich stärker in intestinalen Eosinophilen als in Bluteosinophilen ausgeprägt.

6. Referenzen

- (1) Bucher O, Wartenberg H. Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 12. Auflage ed. Göttingen: Verlag Hans Huber, 1997.
- (2) Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Histologie. 5. Auflage ed. Berlin: Springer Verlag, 2002.
- (3) Meurer A, Kirschfink M, Daniel V. Mikrobiologie und Immunologie pur. 1. Auflage ed. Grünwald: Börm Bruckmeier Verlag GmbH, 2004.
- (4) Mitarbeiter der Lexikon-Reaktion des Verlages Urban&Schwarzenberg. ROCHE Lexikon Medizin. 4. Auflage ed. München: Urban&Schwarzenberg, 1999.
- (5) Straumann A, Simon HU. The physiological and pathophysiological roles of eosinophils in the gastrointestinal tract. *Allergy* 2004; 59:15-25.
- (6) Rothenberg ME, Mishra A, Brandt EB, Hogan SP. Gastrointestinal eosinophils. *Immunological Reviews* 2001; 179:139-155.
- (7) Rothenberg ME, Mishra A, Brandt EB, Hogan SP. Gastrointestinal eosinophils in health and disease. *Advances in Immunology*, Vol 78 2001; 78:291-328.
- (8) Rothenberg ME. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004; 113(1):11-28.
- (9) Ehrlich P. Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten. *Arch Anat Physiol (Leipzig)* 1879; 3:166-169.
- (10) Stevens A, Lowe J. Histologie des Menschen. 2. Auflage ed. Stuttgart: Thieme, 1997.
- (11) Lampinen M, Carlson M, Hakansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy* 2004; 59:793-805.

- (12) Dombrowicz D, Capron M. Eosinophils, allergy and parasites. *Current Opinion in Immunology* 2001; 13(6):716-720.
- (13) Egesten A, Andersson P, Persson T. Eosinophils in gastrointestinal inflammation: From innocent bystanders to offenders. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2002; 37(10):1117-1125.
- (14) Moqbel R, Levischaffer F, Kay AB. Cytokine generation by eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1994; 94(6):1183-1188.
- (15) Munitz A, Levi-Schaffer F. Eosinophils: 'new' roles for 'old' cells. *Allergy* 2004; 59(3):268-275.
- (16) Badewa AP, Hudson CE, Heiman AS. Regulatory effects of eotaxin, eotaxin-2, and eotaxin-3 on eosinophil degranulation and superoxide anion generation. *Experimental Biology and Medicine* 2002; 227(8):645-651.
- (17) Shakoory B, Fitzgerald SM, Lee SA, Chi DS, Krishnaswamy G. The role of human mast cell-derived cytokines in eosinophil biology. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 2004; 24(5):271-281.
- (18) Tefferi A. Blood eosinophilia: A new paradigm in disease classification, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic Proceedings* 2005; 80(1):75-83.
- (19) Rothenberg ME. Mechanisms of disease - Eosinophilia. *New England Journal of Medicine* 1998; 338(22):1592-1600.
- (20) Kato M, Kephart GM, Morikawa A, Gleich GJ. Eosinophil infiltration and degranulation in normal human tissues: Evidence for eosinophil degranulation in normal gastrointestinal tract. *International Archives of Allergy and Immunology* 2001; 125:55-58.
- (21) Walsh GM. Eosinophil granule proteins and their role in disease. *Current opinion in Hematology* 2001; 8:28-33.
- (22) Wardlaw AJ. Eosinophils in the 1990s - New perspectives on their role in health and disease. *Postgraduate Medical Journal* 1994; 70(826):536-552.

- (23) Schmidt RF, Unsicker K. Lehrbuch Vorklinik Teil C: Anatomie, Biochemie und Physiologie der inneren Organe. 1. Auflage ed. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 2003.
- (24) Sjosward KN, Uppugunduri S, Schmekel B. Decreased serum levels of p-selectin and eosinophil cationic protein in patients with mild asthma after inhaled salbutamol. *Respiration* 2004; 71(3):241-245.
- (25) Okamoto S, Nomura H, Matsushima K. Function, molecular structure and gene expression of IL-8. *Nippon Rinsho* 1992; 50(8):1816-1820.
- (26) Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual Review of Immunology* 1998; 16:137-161.
- (27) Bandeira-Melo C, Weller PF. Eosinophils and cysteinyl-leukotrienes. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2003; 69(2-3):135-143.
- (28) Takafuji S, Tadokoro K, Ito K. Effects of interleukin (IL)-3 and IL-5 on human eosinophil degranulation induced by complement components C3a and C5a. *Allergy* 1996; 51(8):563-568.
- (29) Hogan SP, Rothenberg ME. Review article: the eosinophil as a therapeutic target in gastrointestinal disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2004; 20(11-12):1231-1240.
- (30) Gounni AS, Lamkhioued B, Ochiai K, Tanaka Y, Delaporte E, Capron A, Kinet JP, Capron M. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defense against parasites. *Nature* 1994; 367(6459):183-186.
- (31) Rot A, Krieger M, Brunner T, Bischoff SC, Schall TJ, Dahinden CA. Rantes and macrophage inflammatory protein 1-alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *Journal of Experimental Medicine* 1992; 176(6):1489-1495.

- (32) Zeck-Kapp G, Krögel C, Riede UN, Kapp A. Mechanismen of human eosinophil activation by complement protein C5a and platelet-activating-factor: similar functional response are accompanied by different morphological alterations. *Allergy* 1995; 50:34-47.
- (33) Kawashima T, Iwamoto I, Nakagawa N, Tomioka H, Yoshida S. Inhibitory effect of Pemirolast, a novel antiallergic drug, on leukotriene C4 and granule protein release from human eosinophils. *International Archives of Allergy and Immunology* 1994; 103(4):405-409.
- (34) Takafuji S, Bischoff SC, deWeck AL, Dahinden CA. IL-3 and IL-5 prime normal human eosinophils to produce leukotriene C4 in response to soluble agonists. *Journal of Immunology* 1991; 147(11):3855-3861.
- (35) Takafuji S, Tadokoro K, Ito K, Dahinden CA. Effects of physiological soluble agonists on leukotriene C4 production and degranulation by human eosinophils. *International Archives of Allergy and Immunology* 1995; 108:36-38.
- (36) Rothenberg ME. Eotaxin - An essential mediator of eosinophil trafficking into mucosal tissues. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1999; 21(3):291-295.
- (37) Furuta GT, Ackerman SJ, Wershil BK. The role of the eosinophil in gastrointestinal-diseases. *Current Opinion in Gastroenterology* 1995; 11(6):541-547.
- (38) Talley NJ, Kephart GM, McGovern TW, Carpenter HA, Gleich GJ. Deposition of eosinophil granule major basic-protein in eosinophilic gastroenteritis and celiac-disease. *Gastroenterology* 1992; 103(1):137-145.
- (39) Mishra A, Hogan SP, Lee JJ, Foster PS, Rothenberg ME. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *Journal of Clinical Investigation* 1999; 103(12):1719-1727.

- (40) Elovic AE, Ohyama H, Sauty A, McBride J, Tsuji T, Nagai M, Weller PF, Wong DTW. IL-4-dependent regulation of TGF-alpha and TGF-beta-1 expression in human eosinophils. *Journal of Immunology* 1998; 160(12):6121-6127.
- (41) Hogan SP, Foster PS, Rothenberg ME. Experimental analysis of eosinophil-associated gastrointestinal diseases. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2002; 2:239-248.
- (42) Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1998; 158(6):1958-1962.
- (43) Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta-1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 108(4):601-609.
- (44) Delarco JE, Todaro GJ. Growth-factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1978; 75(8):4001-4005.
- (45) Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* 2000; 96(6):2022-2036.
- (46) Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: a general review. *European Cytokine Network* 1996; 7(3):363-374.
- (47) Tanigawa T, Pai R, Arakawa T, Higuchi K, Tarnawski AS. TGF-beta signaling pathway: Its role in gastrointestinal pathophysiology and modulation of ulcer healing. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2005; 56(1):3-13.
- (48) Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2(1):46-53.

- (49) Wong DTW, Elovic A, Matossian K, Nagura N, McBride J, Chou MY, Gordon JR, Rand TH, Galli SJ, Weller PF. Eosinophils from patients with blood eosinophilia express transforming growth factor-beta-1. *Blood* 1991; 78(10):2702-2707.
- (50) Ling EM, Robinson DS. Transforming growth factor-beta-1: its anti-inflammatory and pro-fibrotic effects. *Clinical and Experimental Allergy* 2002; 32(2):175-178.
- (51) Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual Review of Immunology* 1998; 16:137-161.
- (52) Alam R, Forsythe P, Stafford S, Fukuda Y. Transforming growth factor-beta abrogates the effects of hematopoietins on eosinophils and induces their apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 1994; 179(3):1041-1045.
- (53) Bischoff SC. Regulation and function of human intestinal mast cells. In Marone G, Lichtenstein LM, Galli SJ (eds). *Mast cells and basophils*. San Diego, Academic Press 2000;541-565.
- (54) Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *physiological reviews* 1997; 77(4):1033-1079.
- (55) Luttmann W, Franz P, Matthys H, Virchow JC. Effects of TGF-beta on eosinophil chemotaxis. *Scandinavian Journal of Immunology* 1998; 47(2):127-130.
- (56) Babyatsky MW, Rossiter G, Podolsky DK. Expression of transforming growth factors-alpha and -beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996; 110(4):975-984.
- (57) Bischoff SC, Nguyen QT, Mierke C, Meliss RR, Stolte M, Manns MP. Eosinophil-derived production of transforming growth factor-beta-1 in patients with eosinophilic gastroenteritis and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1999; 116(4):A669.

- (58) Stahle-Backdahl M, Malm J, Veress B, Benoni C, Bruce K, Egesten A. Increased presence of eosinophilic granulocytes expressing transforming growth factor-beta-1 in collagenous colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2000; 35(7):742-746.
- (59) Kato Y, Fujisawa T, Nishimori H, Katsumata H, Atsuta J, Iguchi K, Kamiya H. Leukotriene D-4 induces production of transforming growth factor-beta-1 by eosinophils. *International Archives of Allergy and Immunology* 2005; 137:17-20.
- (60) Kadin M, Butmarc J, Elovic A, Wong D. Eosinophils are the major source of transforming growth factor-beta-1 in nodular sclerosing hodgkins-disease. *American Journal of Pathology* 1993; 142(1):11-16.
- (61) Takafuji S, Bischoff SC, deWeck AL, Dahinden CA. Opposing effects of tumor necrosis factor-alpha and nerve growth factor upon leukotriene C4 production by human eosinophils triggered with N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *European Journal of Immunology* 1992; 22(4):969-974.
- (62) Lindl T, Bauer J. *Zell- und Gewebekultur*. 3. Auflage ed. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1994.
- (63) Rumpold H, Kraft D, Obexer G, Bock G, Gebhart W. A monoclonal-antibody against a surface-antigen shared by human large granular lymphocytes and granulocytes. *Journal of Immunology* 1982; 129(4):1458-1464.
- (64) Rumpold H, Kraft D, Obexer G, Radaszkiewicz T, Majdic O, Bettelheim P, Knapp W, Bock G. Phenotypes of human large granular lymphocytes as defined by monoclonal-antibodies. *Immunobiology* 1983; 164(1):51-62.
- (65) Davoine F, Labonte I, Ferland C, Mazer B, Chakir J, Laviolette M. Role and modulation of CD16 expression on eosinophils by cytokines and immune complexes. *International Archives of Allergy and Immunology* 2004; 134(2):165-172.
- (66) Ball ED. CD15 cluster workshop report IN leukocyte typing V. Schlossmann et al. eds. Oxford University Press, Oxford, UK 1995.

- (67) Bettelheim P. Cluster report: CD15 IN typing I. Knapp et al. eds. Oxford University Press, Oxford, UK 1989.
- (68) Venge P. Monitoring the allergic inflammation. *Allergy* 2004; 59(1):26-32.
- (69) Bandeira-Melo C, Bozza PT, Weller PF. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2002; 109(3):393-400.
- (70) Tamura N, Agrawal DK, Townley RG. Leukotriene C4 production from human eosinophils in vitro - role of eosinophil chemotactic factors on eosinophil activation. *Journal of Immunology* 1988; 141(12):4291-4297.
- (71) Wong CK, Wang CB, Ip WK, Tian YP, Lam CWK. Role of p38 MAPK and NF-kappa B for chemokine release in coculture of human eosinophils and bronchial epithelial cells. *Clinical and Experimental Immunology* 2005; 139(1):90-100.
- (72) Bischoff SC, Sellge G, Lorentz A, Sebald W, Raab R, Manns MP. IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96(14):8080-8085.
- (73) Lorentz A, Schwengberg S, Mierke C, Manns MP, Bischoff SC. Human intestinal mast cells produce IL-5 in vitro upon IgE receptor cross-linking and in vivo in the course of intestinal inflammatory disease. *European Journal of Immunology* 1999; 29(5):1496-1503.
- (74) Bischoff SC, Schwengberg S, Raab R, Manns MP. Functional properties of human intestinal mast cells cultured in a new culture system: Enhancement of IgE receptor-dependent mediator release and response to stem cell factor. *Journal of Immunology* 1997; 159(11):5560-5567.
- (75) Rothenberg ME, Owen WF, Silberstein DS, Soberman RJ, Austen KF, Stevens RL. Eosinophils cocultured with endothelial-cells have increased survival and functional-properties. *Science* 1987; 237(4815):645-647.

- (76) Wardlaw AJ. Matrix proteins and eosinophil mediator release. *Clinical and Experimental Allergy* 2000; 30:753-755.
- (77) Hogan SP, Mishra A, Brandt EB, Royalty MP, Pope SM, Zimmermann N, Foster PS, Rothenberg ME. A pathological function for eotaxin and eosinophils in eosinophilic gastrointestinal inflammation. *Nature Immunology* 2001; 2(4):353-360.
- (78) Nakajima H, Gleich GJ, Kita H. Constitutive production of IL-4 and IL-10 and stimulated production of IL-8 by normal peripheral blood eosinophils. *Journal of Immunology* 1996; 156(12):4859-4866.
- (79) Straumann A, Kristl J, Conus S, Vassina E, Spichtin HP, Beglinger C, Simon HU. Cytokine expression in healthy and inflamed mucosa: probing the role of eosinophils in the digestive tract. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11(8):720-726.
- (80) Wright ED, Frenkiel S, Ghaffar O, Al Ghamdi K, Luster A, Miotto D, Hamid Q. Monocyte chemotactic protein expression in allergy and non-allergy-associated chronic sinusitis. *Journal of Otolaryngology* 1998; 27(5):281-287.
- (81) Oliveira SHP, Taub DD, Nagel J, Smith R, Hogaboam CM, Berlin A, Lukacs NW. Stem cell factor induces eosinophil activation and degranulation: mediator release and gene array analysis. *Blood* 2002; 100(13):4291-4297.
- (82) Levi-Schaffer F, Temkin V, Simon HU, Frey JR, Kettman JR, Lefkovits I. Proteomic analysis of human eosinophil activation mediated by mast cells, GM-CSF and TNF-alpha. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2002; 109(1):S166.

7. Danksagung

Mein vornehmlicher Dank gilt Herrn Professor Michael P. Manns, der als Leiter der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Hochschule Hannover das wissenschaftliche Arbeiten in den Laboratorien erst möglich machte. Besonders möchte ich mich bei Herrn Professor Stephan C. Bischoff bedanken, der die vorliegende Dissertationsarbeit wissenschaftlich betreut und ermöglicht hat. Ich möchte auch den Mitarbeitern der Abteilung für Viszeral- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Hochschule unter Leitung von Herrn Professor Jürgen Klempnauer ausdrücklich für die gute Zusammenarbeit danken.

Einen großen Dank möchte ich den gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe aussprechen. Hervorheben möchte ich die sehr gute Arbeitsatmosphäre, Unterstützung und Zusammenarbeit - auch außerhalb der Laborarbeit. Hierbei bin ich Herrn Doktor Axel Lorentz sehr dankbar, der für mich der erste Ansprechpartner war und mir immer hilfreich zur Seite stand. Nicht zuletzt möchte ich mich bei Frau Seza Bolat und Herrn Frank Münnich bedanken. Die beiden, die auch zu meinem privaten Freundeskreis zählen, waren mir immer eine große Hilfe. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Doktor Christian Klein, der mich durch Vorschläge und Kritik weiterbrachte. Vielen anderen meiner Freunde gilt auch mein ausdrücklicher Dank. Hier sei vornehmlich meine Mitbewohnerin Frau Sina Stachura genannt. Auch meiner Familie möchte ich großen Dank aussprechen. Ich bin v.a. meinen Eltern Frau Rosemarie und Herrn Willi Zimmermann sehr dankbar, dass sie mir das Medizinstudium ermöglicht und mich immer unterstützt haben. Deswegen möchte ich ihnen diese Arbeit widmen.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nicole Zimmermann
Geburtsdatum: 03.09.1980
Geburtsort: Hildesheim
Nationalität: deutsch

Ausbildung

Schule:
1993-2000 Gymnasium Josephinum Hildesheim, Abschluss: Abitur
Studium:
2000: Beginn des Studiums der Humanmedizin,
Medizinische Hochschule Hannover
2002: Ärztliche Vorprüfung
2003: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2006: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2007: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Studienabschluss

9. Erklärung nach §2 Abs. 2 Nr. 5 und 6 PromO

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Vergleich der Expression und Freisetzung von Transforming growth factor- β aus humanen eosinophilen Granulozyten aus Blut und Darmmukosa“

in der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie unter der Betreuung von Professor Dr. med. S. C. Bischoff

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel noch nicht erworben habe.

Berlin, den

Nicole Zimmermann