

# Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis.....	9
1. Einleitung .....	1
1.1. Das Immunsystem.....	1
1.2. Organisierte lymphatische Gewebe.....	3
1.2.1. Peyer'sche Platten .....	3
1.2.2. Die Milz als Teil der Immunabwehr .....	3
1.2.3. Immunabwehr im Darm.....	4
1.3. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen .....	4
1.4. Homing/ Rezirkulation .....	5
1.4.1. Kontaktaufnahme mit und Rollen der Lymphozyten entlang des Endothels .....	6
1.4.2. Aktivierung der Lymphozyten durch Chemokine.....	7
1.4.3. Feste Haftung (firm adhesion) am Endothel.....	9
1.4.4. Durchwanderung der Blutgefäßwand (Diapedese) .....	10
1.5. Integrine.....	11
1.5.1. Zytoplasmatische Domäne des $\beta 7$ -Integrins.....	13
1.5.2. Weitere Mutationen mit Einfluss auf Integrinaktivität.....	16
2. Zielsetzung .....	17
3. Material und Methoden .....	18
3.1. Material.....	18
3.1.1. Geräte .....	18
3.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	19
3.1.3. Chemikalien, Reagenzien und Fertiglösungen.....	20
3.1.4. Puffer, Lösungen und Medien.....	22
3.1.5. Zelllinie .....	23
3.1.6. In der immunhistochemischen Färbung verwendete Antikörper .....	24
3.1.7. Antikörper-gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe für das Durchflusszytometer .....	24
3.1.8. Software.....	24
3.2. Methoden .....	24
3.2.1. Auftauen von Endothelzellen aus der bEnd.3 Zelllinie .....	24
3.2.2. Einfrieren von Endothelzellen aus der bEnd.3 Zelllinie .....	25
3.2.3. Züchten von Endothelzellen.....	25
3.2.4. Zellzahlbestimmung.....	26
3.2.5. Immunhistochemische Färbung.....	26
3.2.6. Hämatoxylin-Eosin Färbung .....	28
3.2.7. Vorbereitung von bEnd.3 Zellen und Glas Wells zum <i>in vitro</i> Adhäsionsassay ..	28

3.2.8.	Versuchstiere.....	29
3.3.	Organentnahme und –präparation für <i>in vitro</i> Adhäsions- und <i>in vivo</i> Migrationsassay	30
3.3.1.	<i>in vitro</i> Adhäsionsassay.....	30
3.3.2.	Zellisolierung aus Milz und MLN.....	31
3.3.3.	Zellmarkierung für die <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Assays .....	31
3.3.4.	Durchführung der <i>in vivo</i> Migrationsassays .....	32
3.3.5.	Organaufarbeitung zur Analyse der <i>in vivo</i> Migration .....	32
3.3.5.1.	Blut.....	32
3.3.5.2.	Milz .....	33
3.3.5.3.	MLN .....	33
3.3.5.4.	Dünndarm.....	33
3.3.5.5.	Färbung der isolierten Zellen für die Durchflusszytometrie.....	34
3.3.6.	Durchführung des <i>in vitro</i> Adhäsionsassay .....	36
3.3.7.	Auswertung des Assays .....	37
3.3.8.	Vermessung der Peyer`schen Platten.....	37
3.3.9.	Vorbereitung der DNA für die PCR zur Genotypisierung.....	38
3.3.10.	PCR.....	38
3.3.11.	Agarose-Gel-Elektrophorese .....	39
4.	Ergebnisse .....	41
4.1.	<i>in vitro</i> Adhäsionsassay .....	41
4.1.1.	Adhäsion an Endothelzellen .....	41
4.1.2.	Adhäsion an rekombinantem MAdCAM-1 .....	45
4.2.	<i>in vivo</i> Migrationsassay.....	47
4.2.1.	Kombinierte Auswertung der beiden <i>in vivo</i> Migrationsassays .....	48
4.2.2.	CD19 <sup>+</sup> zu CD3 <sup>+</sup> Quotienten in den <i>in vivo</i> Migrationsassays .....	62
4.2.3.	CD8 <sup>+</sup> zu CD4 <sup>+</sup> Quotienten in den <i>in vivo</i> Migrationsassays .....	64
4.3.	Peyer`sche Platten.....	67
4.4.	Rezeptorexpressionsanalysen .....	69
5.	Diskussion .....	71
5.1.	Die Bedeutung von $\beta 7$ -Integrin für die Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen – Stand der Forschung .....	71
5.1.1.	$\beta 7$ -Integrin spielt eine wichtige Rolle für die Migration von Lymphozyten in den Darm	71
5.1.2.	$\beta 7$ -Integrin hat eine funktionelle Bedeutung für entzündliche Veränderungen des Darms	71
5.2.	Die Bedeutung von Mutationen in der $\beta$ -Kette des $\alpha 4\beta 7$ -Integrins .....	73
5.2.1.	Analyse von Mäusen mit der $\Delta 34$ -Mutation .....	74

5.2.1.1.	Einfluss der $\beta 7$ -Integrin Defizienz auf die Größe der Peyer`schen Platten.....	74
5.2.1.2.	Die Anzahl und Größe von Peyer`schen Platten ist in Mäusen mit $\Delta 34$ -Mutation nicht reduziert.....	74
5.2.1.3.	Lymphozyten von Mäusen mit $\Delta 34$ -Mutation besitzen eine geringe Reduktion der Oberflächenexpression von $\beta 7$ -Integrin gegenüber WT-Lymphozyten.....	75
5.2.1.4.	Lymphozyten mit $\Delta 34$ Mutation besitzen eine verringerte Adhäsionsfähigkeit an stimulierte bEnd.3 Zellen .....	75
5.2.1.5.	Die Adhäsionsfähigkeit von Lymphozyten aus WT-Mäusen und Mäusen mit $\Delta 34$ -Mutation an rekombinantem MAdCAM-1 ist nahezu gleich.....	75
5.2.1.6.	Geändertes Kurzzeitmigrationsverhalten von Lymphozyten mit $\Delta 34$ -Mutation	76
5.2.2.	Analyse von Mäusen mit DR-Mutation.....	77
5.2.2.1.	Bei gleicher Anzahl ist die Größe von Peyer`schen Platten in Mäusen mit DR-Mutation signifikant reduziert .....	77
5.2.2.2.	Lymphozyten von Mäusen mit DR-Mutation besitzen eine geringere Oberflächenexpression von $\beta 7$ -Integrin .....	77
5.2.2.3.	Lymphozyten mit DR-Mutation sind nicht in ihrer Adhäsionsfähigkeit an stimulierte bEND.3 Zellen beeinträchtigt.....	78
5.2.2.4.	Lymphozyten mit DR-Mutation sind nicht in ihrer Adhäsionsfähigkeit an rekombinantes MAdCAM-1 beeinträchtigt.....	78
5.2.2.5.	Geändertes Kurzzeitmigrationsverhalten von Lymphozyten mit DR-Mutation .	79
5.3.	Balance-These .....	80
5.4.	Migration wird durch viele Faktoren gesteuert.....	81
5.5.	Ausblick .....	83
6.	Zusammenfassung.....	85
7.	Literaturverzeichnis .....	87
8.	Anhang.....	96
	Danksagung.....	96
	Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung .....	96
	Erklärung über den Eigenanteil.....	97
	Lebenslauf .....	98