

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und
Gastroenterologie der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum

DISSERTATION

Durchflusszytometrische Charakterisierung dendritischer Zellen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christiane Bielecki

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. D. C. Baumgart
2. Priv.-Doz. Dr. med. F. Obermeier
3. Prof. Dr. med. Y. Dörffel

Datum der Promotion: 19.03.2010

Zusammenfassung

Die Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist bis heute ungeklärt. Es handelt sich um eine ständig wiederkehrende Entzündung bedingt durch unterschiedliche Faktoren. Im Vordergrund steht hierbei eine Anomalität des Immunsystems gegenüber fremden und eigenen Antigenen.

Dendritische Zellen, eine Population hochpotenter Antigenpräsentierender Zellen, besitzen die Fähigkeit, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und danach den B-Zellen oder T-Zellen zu präsentieren. Eine Fehlregulation dendritischer Zellen könnte somit eine Ursache der chronischen Entzündung darstellen.

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurden plasmazytoide dendritische Zellen (PDC) und myeloide dendritische Zellen (MDC) von Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn hinsichtlich ihres Phänotyps und ihrer funktionellen Aufgaben näher untersucht.

Beim Morbus Crohn als auch bei der Colitis ulcerosa zeigte sich bei Patienten, die sich im akuten Entzündungsschub befinden, eine verminderte Anzahl an dendritischen Zellen im peripheren Blut. Zusätzliche Messungen der Oberflächenmarker lassen den Schluss zu, dass es sich bei den dendritischen Zellen, die im Rahmen der Entzündungsreaktion dem peripheren Blut verloren gehen, um unreife dendritische Zellen handelt, die in entzündetes Gewebe auswandern und bei diesem Vorgang reifen.

Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf PDC und MDC-1 Populationen vermehrte die Ausbildung des Migrationsmarkers Alpha4-beta7-Integrin nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten dass dendritische Zellen im Rahmen der Entzündungsreaktion in den Darm migrieren. Deshalb wurden in weiteren Versuchen dendritische Zellen in der Population der CD45+ Zellen der Mukosa mittels FACS Färbungen quantifiziert. Die Mukosa von Patienten mit Colitis ulcerosa und auch Morbus Crohn zeigte im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen einen signifikant höheren Anteil an PDC und MDC-1.

MDC-1 aus peripherem Venenblut wurden zudem isoliert und für Zytokinmessungen nach Stimulation mit LPS (Lipopolysaccharide) kultiviert. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Produktionen der pro-inflammatorischen Zytokine TNFalpha und IL-6 bei Patienten in Remission im Vergleich zu gesunden Probanden. MDC von Patienten reagieren also anders als MDC von gesunden Probanden auf die Begegnung mit pathogenen Substanzen.

Schlagwörter:

Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Dendritische Zellen, Entzündung,
Antigenpräsentation, Zytokine

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	9
1.1.1	Definition	9
1.1.2	Immunologische Vorgänge	11
1.2	Dendritische Zellen und das intestinale Immunsystem	12
1.2.1	Charakterisierung dendritischer Zellen	12
1.2.2	Aufgabe dendritischer Zellen im Immunsystem	15
1.3	Die Rolle dendritischer Zellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	19
1.4	Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit	21
2	Patienten und Methoden	22
2.1	Patientengut	22
2.2	Antikörper und Reagenzien	25
2.2.1	Puffer und Medien	25
2.2.2	Kulturzusätze	26
2.2.3	Antikörper	27
2.2.4	Weitere Reagenzien	28
2.2.5	Geräte	28
2.3	Zellisolation	29
2.3.1	Isolation von peripheren monozytären Blutzellen	29
2.3.2	Aufbereitung der Zellen aus humanem Darmgewebe	29
2.3.3	Magnetische Zellseparation	30
2.3.4	Durchflusszytometrie	32
2.4	Messung von Charakterisierungsmarkern dendritischer Zellen	33
2.4.1	Messung von Reife- und Aktivierungsmarkern	33
2.4.2	Messung von Migrationsmarkern	33
2.5	Kultur dendritischer Zellen	34
2.5.1	Messungen des Zytokinmusters von MDC nach Aktivierung	34
2.5.2	Messung der Zytokinproduktion	34
2.5.3	Statistische Analyse	35
3	Ergebnisse	36

3.1	Dendritische Zellen von CED Patienten zirkulieren vermindert im peripheren Blut	36
3.1.1	Quantifizierung dendritischer Zellen im peripheren Blut	36
3.1.2	Phänotypisierung dendritischer Zellen im peripheren Blut von CED Patienten	42
3.2	Dendritische Zellen von CED Patienten akkumulieren in der intestinalen Mukosa	46
3.2.1	Nachweis von „homing Markern“ auf dendritischen Zellen	46
3.2.2	Nachweis dendritischer Zellen in der intestinalen Mukosa	48
3.3	Funktionelle Untersuchungen an dendritischen Zellen	51
3.3.1	Stimulationsversuche an dendritischen Zellen (CBA)	51
4	Diskussion	55
4.1	Quantitative Messungen an dendritischen Zellen aus peripheren Venenblut	56
4.2	Oberflächenmarker Bestimmungen an periphere dendritischen Zellen	58
4.2.1	Messung kostimulatorischer Moleküle an dendritischen Zellen	58
4.2.2	DC bilden im Entzündungszustand vermehrt Migrationsmarker aus	61
4.2.3	Nachweis von DC Populationen in humaner Darmmukosa	63
4.3	Isolation der DC aus peripherem Venenblut	65
4.4	Kultur mit isolierten dendritischen Zellen aus peripheren Venenblut	66
4.5	Isolierte MDC produzieren in Kultur mit LPS vermehrt TNFalpha und IL-6	68
4.6	Ausblick	71

Meinen Eltern gewidmet

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen presenting cell (Antigen präsentierende Zelle)
AK	Antikörper
BDCA	Blood dendritic cell antigen
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CBA	Cytometric Bead Array
CCR	Chemokinrezeptor
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CpG-DNA	DNA Oligonukleotide mit unmethylierten CpG Motiven
CU	Colitis ulcerosa
DC	Dendritische Zelle(n)
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
HBSI	Harvey-Bradshaw Index für Morbus Crohn
HLA	Human Leukocyte Antigen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Lin	Linienspezifische Marker
LPMC	Lamina Propria Mononukleäre Zellen
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	Magnetischer Zellsortierer
MC	Morbus Crohn
MDC	Myeloide dendritische Zelle(n)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MTWSI	Modified Truelove Witts Severity Index für Colitis Ulcerosa
nTC	naive T-Zelle(n)
PBMC	periphere monozytäre Blutzellen
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PDC	Plasmazytoide dendritische Zellen(n)
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
RT	Raumtemperatur
SE	Standardfehler
SLE	Systemischer Lupus erythemathodes
TGF	Transforming growth Faktor
TNFalpha	Tumornekrose Faktor alpha
Treg	regulatorische T-Zellen

1 Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

1.1.1 Definition

Der Begriff chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) umfasst Krankheitsbilder, bei denen es zu Immunsystem vermittelten, ständig wiederkehrenden Entzündungen des Darmes kommt, wobei die Ätiologie dieser Entzündungen noch ungeklärt ist. Zu Ihnen gehören im Wesentlichen der Morbus Crohn (MC), die Colitis ulcerosa (CU), die mikroskopische Kolitis und die Zöliakie.

1.1.1.1 Morbus Crohn

Häufige Symptome des MC sind Durchfall, Fieber und Gewichtsverlust (1). Der MC kann den gesamten Gastrointestinaltrakt befallen, häufig beginnt er jedoch im terminalen Ileum, wo er bei 25-40% der Patienten auch als alleinige Befallsstelle bestehen bleibt (2).

Von der Krankheit sind vor allem junge Menschen betroffen. Die höchste Zahl der Neuerkrankungen beim MC liegt in der Altersgruppe der 15- bis 24-Jährigen (3).

1.1.1.2 Colitis ulcerosa

Das Leitsymptom der CU sind die blutig-schleimig-eitrigen Durchfälle (4). Es handelt sich um eine sich kontinuierlich ausbreitende Erkrankung, die weitgehend die distalen Darmabschnitte betrifft. Sie bleibt bei circa 50-70% der Patienten auf das Rektum und Sigma beschränkt (5).

Die Stuhlfrequenz bei CU beträgt nicht selten mehr als 15 flüssige Stühle pro Tag und stellt so eine extreme Einschränkung der Lebensqualität für die betroffenen Patienten dar. Bei der CU muss man bei den Inzidenz-Gipfeln einen Geschlechterunterschied berücksichtigen. Frauen erkranken meist im Alter zwischen 25 und 34 mit rapidem Rückgang der Inzidenz nach diesem Peak, wohingegen bei Männern das Erkrankungsrisiko bis ins Alter hoch bleibt (3).

Sowohl bei der CU als auch beim MC wurde als Folge der Erkrankung ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms nachgewiesen (6;7).

1.1.1.3 Epidemiologie

Trotzdem es schon im Jahre 1623 erste Hinweise auf den möglichen Befund „Morbus Crohn“ im Rahmen einer Autopsie bei einem Kind durch *Wilhelm Fabry* gab (8) und weiterer Einzelbeschreibungen im 19. Jahrhundert folgten, verging viel Zeit, bis im Jahre 1932 *Crohn, Oppenheimer* und *Ginzburg* im „Journal of the American Medical Association“ eine genauere Beschreibung des Krankheitsbildes MC veröffentlichten (9). Die CU wurde bis auf einzelne Fallbeschreibungen erstmals 1909 von *Cameron* und *Rippman* in London in umfassenderer Form beschrieben (10;11).

Zu den am häufigsten genannten Risikofaktoren des MC und der CU zählt zum Beispiel die genetische Disposition. Studien ergaben eine erhöhte Konkordanz vor allem für MC bei monozygoten Zwillingen (12-14).

Umweltfaktoren, infektiöse Erkrankungen, ethnische Unterschiede, sozioökonomischer Status sowie die Ernährung, orale Kontrazeptiva und auch psychische Faktoren sind ebenfalls häufige Risikofaktoren (15-18).

Die nach wie vor ungeklärten Ursachen dieser Erkrankung, so wie die dramatische Einschränkung der Lebensqualität verdeutlicht, wie wichtig Forschung auf dem Gebiet der CED Erkrankungen ist, um die genaueren immunologische Vorgänge im Darm besser verstehen zu können.

1.1.2 Immunologische Vorgänge

Nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft handelt es sich bei den Ursachen der CED um ein Zusammenspiel der verschiedenen genannten Risikofaktoren und einer Abnormalität des mukosalen Immunsystems in der Reaktion gegenüber fremden sowie auch eigenen Antigenen (19).

Das gesunde Darmsystem wird im Laufe eines Lebens mindestens 400 verschiedenen potentiell pathogenen Bakterien, anderen Mikroorganismen und mehrzelligen Parasiten ausgesetzt (20). Es verfügt jedoch über die Möglichkeit, zwischen pathogenen und nicht pathogenen Antigenen zu unterscheiden und entsprechend mit einer Immunreaktion oder Toleranz gegenüber diesen zu reagieren (21). An der Kontrolle dieser Vorgänge sind zahlreiche verschiedene Zelltypen beteiligt. Dazu gehören die verschiedenen T-Helferzellpopulationen, die zytotoxischen T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Monozyten und die antigenpräsentierenden Zellen. Ein Zusammenspiel dieser Populationen bestimmt das Immunsystem des Darmes (GALT = gut-associated lymphoreticular tissue) in Bezug auf Toleranz und Immunität (22).

Eine wesentliche Zellpopulation sind die T-Zellen, die eine starke Immunreaktion hervorrufen, aber auch verhindern können. Verschiedene T-Zell-Subpopulationen, charakterisiert durch ihre unterschiedlichen Zytokinmuster, sind hierbei auch für die verschiedenen Reaktionstypen verantwortlich (23). Man unterscheidet bei den T-Zellen zwischen den CD4 positiven T-Helfer Zellen und den CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen. Die Helferzellen unterteilen sich weiter in die proinflammatorischen Th1- und Th2-Zellen und in die regulatorischen T-Zellen. Für die Th1-Zellen ist eine hohe IFN-gamma, TNFalpha und Interleukin-2 Produktion charakteristisch. Die Th2-Zellen dagegen produzieren vor allem Interleukin 4, 5, 9 und 13 (24).

Neuere Daten und Untersuchungen stellen diese Aufteilung der TC in Frage und bringen eine neue TC Population ins Spiel, die der CD4 positiven Effektorzellen Th17 (25). Die Entwicklung dieser Population wird durch Th1 und Th2 typische Zytokine (IFN-gamma und IL-4) supprimiert. Zytokine wie TGF-beta und IL-6 hingegen führen zur Entstehung dieser T-Zell Subpopulationen (26;27).

Als regulatorischen T-Zellen werden die Th3-Helferzellen und weitere regulatorische T-Zellen wie Tr1-Zellen, bezeichnet. Th3-Zellen sind typisch durch ihre TGF-beta Produktion, wohingegen die regulatorischen T-Zellen vor allem das antiinflammatorische Zytokin Interleukine 10 produzieren. Die regulatorischen T-Zellen lassen sich anhand der

Zytokinmuster und Oberflächenmarker noch in weitere Untergruppen unterteilen (28) und bilden so ein komplexes System im Rahmen von Entzündungsreaktionen der Darmschleimhaut. Ein Schaden bei diesen Zellen könnte ein Grund für die unkontrollierten Entzündungsreaktionen sein, die bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auftreten (29).

Damit die T-Zellen des Darmes auf die Antigene von Bakterien, Viren und anderen Partikeln reagieren können, müssen diese vorher prozessiert werden. Diese Aufgabe übernehmen im Darm die antigenpräsentierenden Zellen (APC) der Lamina Propria und Peyer Plaques. Es gibt verschiedene Gruppen von APC. Eine der wichtigsten Populationen sind die dendritischen Zellen (DC), auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

1.2 Dendritische Zellen und das intestinale Immunsystem

1.2.1 Charakterisierung dendritischer Zellen

Im Jahre 1973 wiesen *Steinman* und *Cohn* erstmals DC in der Milz von Mäusen direkt nach (30). Die Isolation der DC in größerer Zahl aus menschlichem Blut gelang der Gruppe um *Romani* im Jahre 1994 (31). *Bell* und Mitarbeiter isolierten 2001 DC Populationen direkt aus menschlichem Darm (32).

Ebenso wie viele andere Zellen entwickeln sich auch die DC aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Die Vorläuferzelle der DC ist die CD34 positive Stammzelle. Diese teilt sich in die myeloiden und lymphoiden Vorläuferzellen (33).

Die weiter ablaufenden Unterteilungen können anhand von Oberflächenmarkern klassifiziert werden. Myeloide Zellen werden in CD14+, CD11c+ und CD1-monozytäre Zellen und CD14- Cd11c+ und Cd1+ Langerhanszellen eingeteilt. Aus den monozytären Zellen entstehen interstitielle DC bzw. interstitielle Makrophagen. Die Langerhans Zellen teilen sich in dendritische Langerhanszellen und Langerhans Makrophagen auf.

Die lymphoiden CD14-, CD11c- und IL3Ralpha+ Zellen entwickeln sich zu lymphoiden (plasmazytoiden) DC (34).

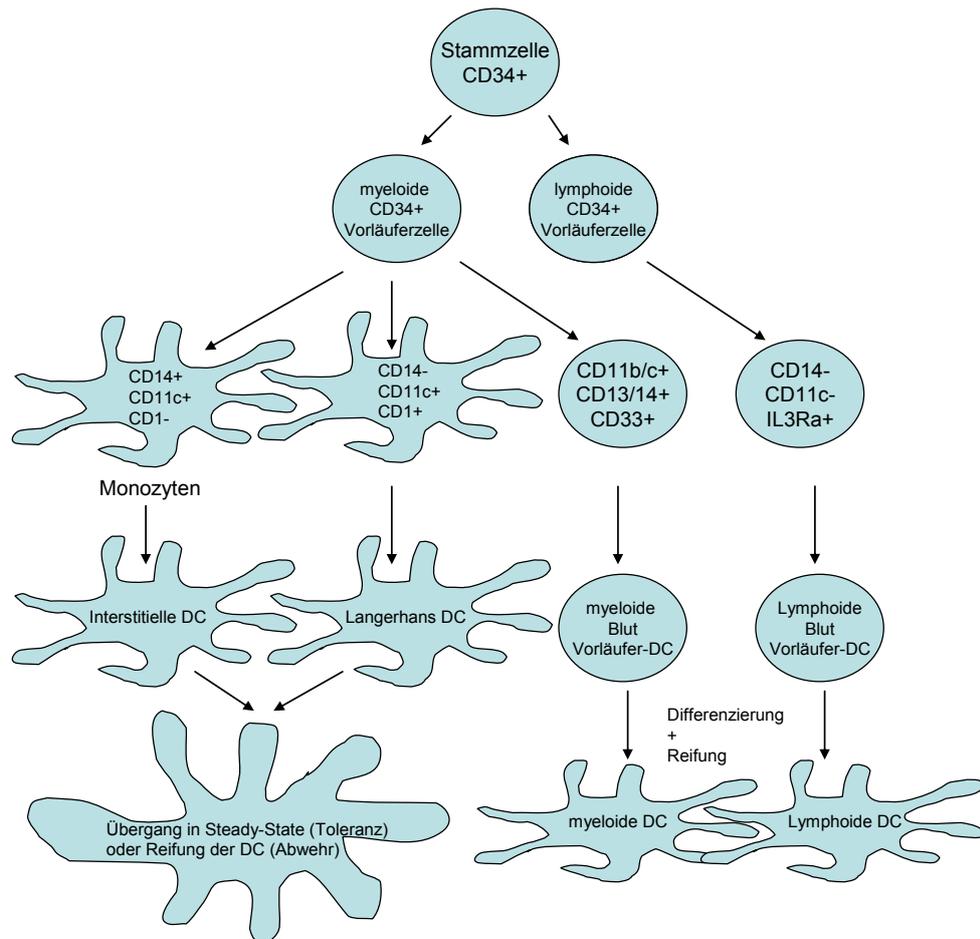


Abbildung 1: Hämatopoetischer Differenzierungsweg lymphoider und myeloider dendritischer Zellen aus CD34+ Stammzellen, modifiziert nach (33),(34).

Steinman unterteilte 1991 die DC bezüglich des Vorkommens im Organismus in folgende Gruppen ein; DC der lymphatischen Organe, zirkulierende DC und DC der nicht lymphatischen Organe. Der Anteil an DC im menschlichen peripheren Blut beträgt weniger als 0,1% der weißen Blutzellen.

Alle genannten Zellen haben jedoch eines gemeinsam, ihre Fähigkeit als hochpotente APC zu agieren (35).

Der Phänotyp der DC unterscheidet sich von anderen Zellen durch das Fehlen typischer Leukozytenmarker, wie CD3 (T-Zell Marker), CD14 (Marker für Monozyten und Makrophagen), CD 19/20 (B-Zell Marker) und CD 56/16 (NK-Zell Marker) (36).

Charakterisieren lassen sich DC über ihre Oberflächenmarker zur Antigenpräsentation (MHC I, II und CD1), über Adhäsions- und kostimulatorische Moleküle wie z.B. CD24, CD50, CD54, CD58, CD80 und CD86 oder über sogenannte „homing marker“, die bei der

Wanderung von DC in lymphatische Gewebe (homing) ausgebildet werden können. Bekannt sind für dendritische Zellen die homing marker CD11a, b, c, CD49d, CD44 Varianten und E-Cadherin (37).

Unter dem Elektronenmikroskop ist zu erkennen das DC lange bewegliche Ausläufer ausbilden, die ihnen bei der Fortbewegung im Körper und der damit verbunden Antigenaufnahme und Präsentation behilflich sind. Die einzelnen Ausläufer können sich bis auf 30 µm ausstrecken und in einem Bogen von 180° in 30 bis 60 Sekunden ihre Umgebung abtasten (36).

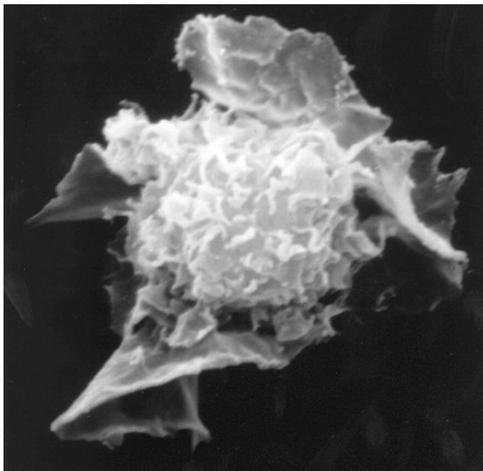


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer dendritischen Zelle (38).

DC des peripheren Blutes sind verschiedenartig in ihrer Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker. Nach dem derzeitigen Wissensstand unterscheidet man zwischen den myeloiden dendritischen Zellen (lineage-CD11c+CD123_{low}) und den lymphoiden (plasmazytoiden) dendritischen Zellen (lineage-CD11c-CD123_{high}). Zur weiteren Identifizierung werden Oberflächenmoleküle herangezogen, deren Expressionsmuster die Unterscheidung in Subtypen ermöglicht. Hier als Beispiel anzuführen CD303/CD123+/HLA-DR+ für PDC. Typische Marker der MDC1 Subpopulation sind CD1c/CD11c+/HLA-DR+, wohingegen die MDC2 CD141/CD32-/CD64-/HLA-DR+ Oberflächenmarker exprimieren (39-41).

Zusätzliche dendritische Zellmarker speziell für aktivierte DC sind die sogenannten Reifemarker DC-Lamp und CD 83 (42;43).

Funktionen der DC im Immunsystem:

- DC haben die Fähigkeit, eine Immunreaktion und Differenzierung bei nTC hervorzurufen. Jede DC kann bei diesem Vorgang bis zu 3000 TC aktivieren (44).
- DC können sich durch Gewebe fortbewegen und so zu den lymphatischen Regionen wandern.
- DC phagozytieren spezifisch Antigene um diese anschließend zu präsentieren.
- Durch spezifische Oberflächenmarker, die dem jeweiligem Differenzierungszustand der DC entsprechen, unterscheiden sie sich diese von anderen Leukozytenpopulationen.

1.2.2 Aufgabe dendritischer Zellen im Immunsystem

Dendritische Zellen stellen eine Verbindung zwischen dem nicht lymphatischen Gewebe und dem lymphatischen Gewebe dar. Sie besitzen die Fähigkeit, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und danach B-Zellen oder T-Zellen zu präsentieren.

Im Darm kommen DC sowohl in dem mit dem Darm assoziierten Immunsystem, in der Lamina propria als auch im Epithelium selbst vor (32;45;46).

Von dort können sie, wie in Abbildung 1 dargestellt, über vier verschiedene Wege mit den Antigenen in Kontakt kommen. Ihnen kann das Antigen über M-Zellen (Membranöse Zellen) dargereicht werden, die in den Payerschen Platten der Mukosa sitzen [3]. Sie können auch durch die tight junctions der Epithel Zellen direkt auf Antigene im Lumen des Darmes zugreifen [2]. Ein weiterer Weg ist der Transport durch die Epithelzellen selber hin zu den DC [1]. Im Falle einer defekten Epithelschicht können die Antigene auch direkt eindringen und die DC erreichen [4] (47-49).

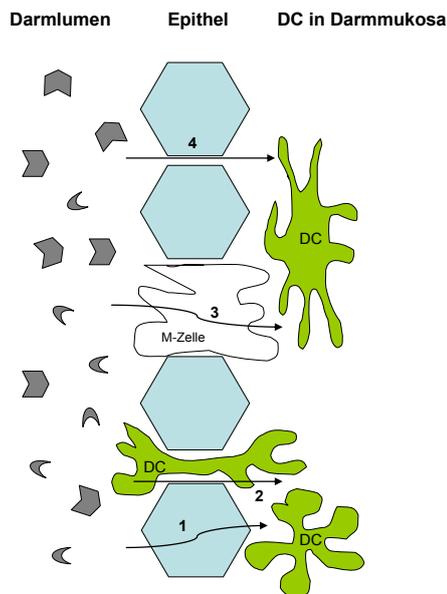


Abbildung 3: Dendritische Zellen können über 4 verschiedenen Wege mit dem Antigen im Lumen des Darmes in Kontakt kommen, modifiziert nach (38).

Danach verfügt die DC über verschiedene weitere Möglichkeiten, das Antigen aufzunehmen. Über rezeptorvermittelte Endozytose oder durch Phagozytose und Makropinozytose in Form von großen intrazellulären Vakuolen (50).

Im Verlauf des Prozesses der Antigenaufnahme und Präsentation wandern die DC aus den Blut- oder Lymphstrombahnen der peripheren Gewebe zu den lymphatischen Organen (35). Auf dem Weg dorthin, sowie direkt in den lymphatischen Geweben des Darmes oder in den Lymphknoten treffen die APC auf die T-Zellen und können durch Präsentation der Antigene eine Immunantwort auslösen (51).

Bedingt durch ihre Funktion im Immunsystem liegen die DC im Organismus in verschiedenen Reife- und Differenzierungszuständen vor. Man unterscheidet zwischen den „unreifen“ und den „gereiften“ DC.

Eine Reifung der Zellen findet statt, wenn es nach der Antigenaufnahme und Prozessierung im Rahmen einer Infektion oder Entzündung zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (IL-1beta, IL-6 oder TNFalpha) kommt.

Während der Reifung und Aktivierung von DC werden die sogenannten Histokompatibilitätsmoleküle (MHC), die sich im unreifen Zustand nur in geringer Menge auf der Zelloberfläche befinden um ein vielfaches hochreguliert (52). Dadurch werden die DC zu hochpotenten APC. Anschließend werden die Antigene den CD4-T-Helferzellen präsentiert, die meist eine Entzündungsreaktion in Gang setzen. Sie können aber auch

CD8-zytotoxischen T-Zellen oder B-Zellen präsentiert werden. Die DC kann ihr prozessiertes Antigen auch nicht Antigen spezifische Zellen, wie z.B. Makrophagen und natürlichen Killerzellen präsentieren (34).

Die Präsentation der prozessierten Antigene geschieht über die MHC der Klasse I bzw. II, die sich an der Oberfläche der APC befinden. Intrazelluläre Antigene werden durch den Klasse I Rezeptor, extrazelluläre Antigene über Klasse II Rezeptoren den zytotoxischen T-Zellen als auch den T-Helferzellen präsentiert (37).

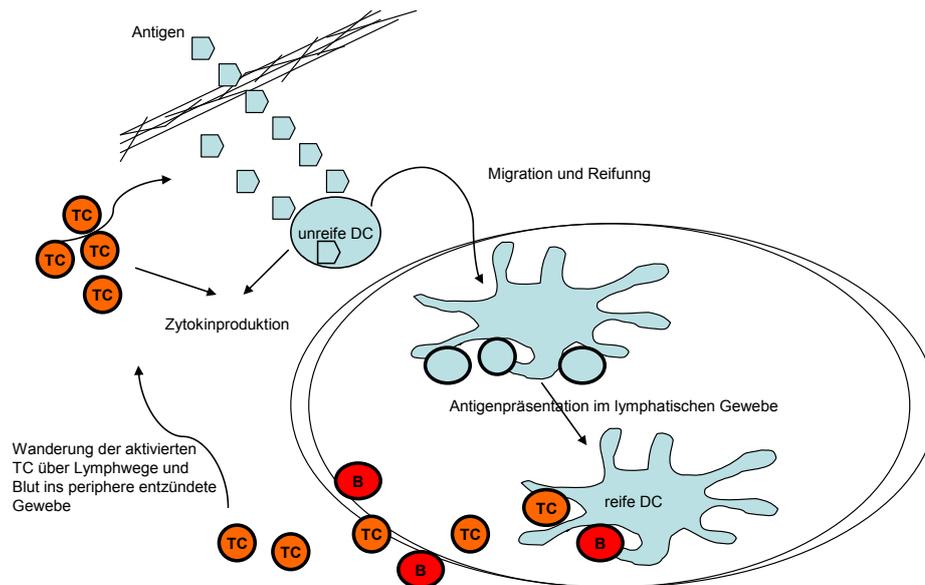


Abbildung 4: Dendritische Vorläuferzellen (unreife DC) nehmen im peripheren Gewebe Antigene auf. In Gegenwart von Gefahrensignalen findet eine Aktivierung der Zellen statt und sie wandern in T-Zell Regionen der lymphatischen Gewebe. Dort präsentieren sie die Antigene den Lymphozyten (TC = T-Zellen, B = B-Lymphozyten). Die aktivierten T-Lymphozyten wandern nun als Effektorzellen über die Lymph- und Blutgefäße in die entzündeten Gebiete, modifiziert nach (34), (37).

Wird ein Antigen als pathogen erkannt, werden kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86) und T-Zell Adhäsionsmoleküle (CD48 und CD58) auf den DC hochreguliert (53), was zu einer verstärkten Reaktion zwischen T-Zelle und APC führt. Die T-Zellen wiederum erkennen das ihnen präsentierte Antigenfragment über den T-Zell-Rezeptor (TCR), der sich auf ihrer Oberfläche befindet (54).

Durch beschriebene Interaktion mit den naiven TC haben DC die Möglichkeit, T-Zellen zum Proliferieren zu veranlassen und durch weitere Signale Einfluss auf deren Differenzierung in die verschiedenen T-Zell-Subpopulationen zu nehmen (38).

Bei der T-Zell Polarisierung spielen Zytokine eine wichtige Rolle (23). Der Kontakt von DC mit Lipopolysacchariden, bakterieller CpG DNA, viraler DNA, T-Zell-Signalen, wie CD40 oder IFN-gamma, induziert eine Interleukin-12-Produktion der Zelle, und leitet so eine TH1 Immunantwort ein. Antiinflammatorische Moleküle wie Interleukin 10, TGF-beta, Prostaglandin 2 und Kortikosteroide inhibieren die Interleukin-12-Produktion dendritischer Zellen und induzieren somit eine Th2 oder regulatorische T-Zell Antwort (33).

Erfolgt eine Antigenaufnahme ohne weiteren Stimulus, kann die DC in ihrem unreifen Zustand verweilen. Dieser Zustand wird auch „steady state“ genannt und beschreibt die tolerogene Eigenschaft der Zellen gegenüber verschiedenen Antigenen. Durch diese Eigenschaft kann sie den Organismus vor Autoaggression gegenüber körpereigenen Antigenen schützen (55).

Trifft die DC im unreifen Zustand auf nTC, kann sie diese zur Differenzierung in regulatorische T-Zellen stimulieren, die dann das anti-inflammatorische Interleukin-10 produzieren (56).

Dieses spezifisch hoch entwickelte Erkennungssystem molekularer Strukturen (Proteine und Peptide) durch APC wird auch als „erworbene Immunität“ bezeichnet. Eine wesentliche Rolle spielen bei diesen Vorgängen das Interleukin-2 und die Zytokine Interleukin-4 und IFN-gamma (57). Weiterhin kann ein immunologisches Gedächtnis, in Form von T-Gedächtniszellen entwickelt werden, das anschließend auf ursprüngliche Antigene verstärkt oder schneller reagieren kann.

DC haben auch die Möglichkeit, auf die angeborene Immunität einzuwirken. Sie stellen somit eine Verbindung zwischen den beiden Formen der Immunabwehr dar. Im Falle der angeborenen Immunität erfolgt eine schnelle Reaktion gegenüber den verschiedensten Mikroorganismen mit unspezifischen Substanzen wie z.B. Lysozymen, Akute-Phase-Proteinen und Interferonen. DC können auf diese mikrobiellen Veränderungen durch Produktion von Zytokinen, wie Interleukin 12, Interferone Typ 1 und 2, und durch Aktivierung natürlicher Killerzellen reagieren, die pathogene Bakterien oder infizierte Zellen phagozytieren können (58).

Die DC erkennt bakterielle Produkte im Rahmen der angeborenen Immunität über sogenannte „pattern recognition Receptors“ (PRR). Zu dieser Gruppe von Rezeptoren

zählen die Toll-like Rezeptoren, von denen gegenwärtig 10 verschiedene Typen bekannt sind (59), das Lipopolysaccharid von Bakterien wird von DC über den TLR-4 Rezeptor, CpG über den TLR-9 Rezeptor erkannt (60-62).

Die über TLR vermittelte Erkennung von Antigenen durch die DC lässt diese reifen und in einen aktivierten Zustand übergehen. Dieser Zustand ermöglicht es der DC eine starke T-Zell-Reaktion hervorzurufen. Somit hat der TLR-Aktivierungspfad ebenfalls starken Einfluss auf die erworbene Immunität (63).

Die DC haben demnach die Möglichkeit, bei der Aufnahme von Antigenen zwischen „pathogen“ und „nicht pathogen“ zu unterscheiden. Sie haben großen Einfluss auf die Entscheidung, ob der Organismus einem Antigen gegenüber mit einer tolerogenen oder immunogenen Immunantwort reagiert. Diese Entscheidung ist abhängig von dem jeweiligen anatomischen Ort des Zusammentreffens zwischen DC und T-Zelle, der lokalen Umgebung und dem Aktivierungszustand der DC (64).

1.3 Die Rolle dendritischer Zellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die abnorme Funktion des Immunsystems bei CED Patienten beruht auf einer unangemessenen T-Zell Immunantwort gegenüber eigenen und fremden Antigenen (19). Bei der Vielzahl der Mikroorganismen, die den Darm besiedeln, ist gerade die Toleranz gegenüber physiologischen Keimen von besonderer Bedeutung. Diese lokale Toleranz ist bei CED-Patienten im Entzündungsstadium nicht mehr vorhanden. Unter normalen Bedingungen kann bei einer T-Zell-Antwort des Immunsystems zwischen pathogenen und nicht pathogenen Erregern unterschieden werden. Bei CED Patienten kommt es dagegen zu einer überschießenden Immunantwort auf die eigene Mikroflora (65).

Die Gründe hierfür sind verschieden. Zum einen entspricht das Darmepithel und somit die intestinale Barriere von CED Patienten nicht den gleichen Anforderungen, wie es bei gesunden Menschen der Fall ist. Das Epithel ist durchlässiger und lässt in vermehrter Weise schädliche Antigene eindringen (66;67).

Es wurde außerdem in Versuchen mit Tiermodellen ein Zusammenhang zwischen der im Darm vorherrschenden bakteriellen Flora und der Entstehung von CED Erkrankungen nachgewiesen (68).

Veränderungen im Bereich der Erkennung von bakteriellen Produkten über TLR Rezeptoren wurden ebenfalls aufgezeigt. Es konnte eine erhöhte Allelfrequenz des TLR-4 Asp299Gly Polymorphismus bei MC- und CU-Patienten nachgewiesen werden (69).

Weitere Untersuchungen zeigten eine erhöhte Expression von TLR-2 und TLR-4 Rezeptoren auf der Oberfläche von MDC Populationen aus Darmbiopsien von CED Patienten (70).

NOD2/CARD15, ein Gen, welches eine wichtige Rolle in der Erkennung von bakteriellen Lipopolysacchariden durch Leukozyten spielt, wird ebenfalls mit der Entstehung von CED in Verbindung gebracht. Defekte in Bereich dieses Gens wurden bei CED Patienten vermehrt nachgewiesen (71). Eine Fehlregulation dieser Erkennungsmechanismen könnte eine Reaktion des Immunsystems gegenüber bakteriellen Antigenen verstärken und so zu einer schweren Entzündung führen (72), wie sie bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vorkommt.

Es gilt als anerkannt, dass die Entzündung des Darmes bei der CU vorwiegend auf einer Th2-Antwort beruht, wohingegen bei MC eher eine Th1-Antwort für die starke Entzündung verantwortlich ist (18;73;74). Diese Beobachtungen beruhen auf speziellen Zytokinmustern, die spezifisch für die TC Immunantworten sind.

Beim MC finden sich verstärkt Th1 spezifische Zytokine, wie z.B. IFN-gamma (73). Für CU ist diese Zytokinbestimmung weniger eindeutig, da das für die Th2-Antwort typische Interleukin 4 erniedrigt ist. Andererseits wurde beobachtet, dass Interleukin 5, ein Zytokin das im Zusammenhang mit CU Autoantikörper bildet, die eine Th2-Antwort unterstützen, in erhöhtem Maße bei CU Patienten vorhanden ist (73;75).

Die Th1 bzw. Th2 Antwort führt durch Zytokinproduktion und T-Zellreaktion zu einer Kaskade von Zellaktivierungen, die letztendlich in einer starken Entzündung des Darmes resultiert (76).

Die DC als eine wichtige Zelle im Rahmen eines Entzündungsgeschehens, bedingt durch ihre Ag-Präsentation und nTC Aktivierungspotential, rückt somit in den Mittelpunkt der Ursachenforschung bei CED Erkrankungen (38). Veränderungen im Rahmen der TC Aktivierung und Differenzierung induziert durch DC wurden bereits an Mäuse Modellen nachgewiesen. Es wurden bei CU erkrankten Mäusen vermehrt DC in Darmlymphknoten nachgewiesen, die zudem in erhöhtem Masse Aktivierungsmarker (CD134L) auf ihrer Oberfläche trugen (77).

Untersuchungen an Lamina propria Gewebe von CED Patienten zeigten ebenfalls, dass DC aus entzündetem Gewebe vermehrt Aktivierungsmarker wie z.B. CD40 aufwiesen,

und diese unter Behandlung mit TNFalpha Antikörpern (z.B. Infliximab) weniger wurden (38).

Die medikamentöse Gabe von Antikörpern gegen wichtige Zytokine der Th1-Antwort gilt als anerkannte Therapie bei MC (78).

Durch Aktivierung regulatorischer T-Zellen als Antwort auf Antigene hat die DC die Möglichkeit Entzündungsreaktionen abzuschwächen. Regulatorische T-Zellen sind bei CED Patienten im peripherem Blut jedoch vermindert vorhanden (79). Es existieren Überlegungen, die Gabe von regulatorischen T-Zellen als Behandlungsvariante für CED Patienten einzusetzen (80).

Die genannten Beispiele zeigen, dass Veränderungen in der Struktur und somit auch Veränderungen in der Funktionsweise der DC Auswirkungen auf das Immunsystem von Patienten mit CED haben könnten. Weitere Forschung auf dem Gebiet dieser Zellpopulationen bei Erkrankten würde näheren Aufschluss über die veränderten Funktionsweisen der DC geben und könnte somit entscheidend zu deren Heilung beitragen.

1.4 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll versucht werden, das Immunsystem von CED Patienten näher zu erforschen. Es gilt als anerkannt, dass das Immunsystem von CED Patienten funktionelle Veränderungen aufweist, die für die Pathogenese der Erkrankungen ursächlich sind.

Die dendritische Zelle spielt eine Schlüsselrolle im Rahmen der intestinalen Immunabwehr. Untersuchungen bezüglich der Morphologie, des Immunphänotyps und der funktionellen Eigenschaften können Aufschluss über die Rolle der DC bei CED Erkrankungen geben.

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, genauere Aussagen über den Phänotyp, die Lokalisation und die funktionellen Aufgaben von DC bei CED Patienten treffen zu können.

Hierfür wurden Messungen zur Quantifizierung der Populationen und zur Bestimmung von Oberflächenmarkern an peripheren Blut DC und Darm-DC vorgenommen. Die funktionellen Aufgaben dendritischer Zellen sollten anhand von Messungen der Zytokinproduktion näher untersucht werden.

Als Hypothese wurde dabei angenommen, dass sich DC von CED Patienten bezüglich oben genannter Parameter von DC gesunder Probanden unterscheiden.

2 Patienten und Methoden

2.1 Patientengut

Es wurde das periphere Blut von Patienten untersucht, die zur Behandlung ihrer Erkrankung die Sprechstunde für CED am Campus Virchow Klinikum der Charité Berlin besuchten. Als Referenzkontrolle wurde Blut von freiwilligen gesunden Probanden verwendet, die sich zum Teil aus Labor und auch aus Klinikpersonal zusammensetzten. Alle teilnehmenden Personen wurden über die Studien informiert und gaben ihr Einverständnis.

Leukozytenfilter, die der Blutbank der Charité zur Verfügung gestellt wurden, wurden bei der Auswertung ebenfalls wie gesunde Kontrollpersonen eingestuft.

Die zur Zellisolation benötigten Mukosa-Präparate wurden aus Darmresektaten von CED Patienten gewonnen, die im Rahmen routinemäßig durchgeführter Eingriffe im DRK Klinikum Westend, Berlin und im Charité Klinikum Virchow, Berlin operiert wurden. Referenzen waren in diesem Fall Mukosapräparate von Patienten, die nicht an CED erkrankt waren. Hier handelte es sich vorwiegend um Patienten mit Sigma-Divertikulitis oder Karzinomen.

Die Einteilung der Patienten erfolgte auf der Basis bekannter Indizes zur Bestimmung der Krankheitsaktivitäten. MC Patienten wurden nach dem Harvey Bradshaw Index (HBSI) (81) klassifiziert, CU Patienten mit Hilfe des modifizierten Truelove Witts Index (MTWSI) (82).

Tab. 1: Auflistung zur Bestimmung des Harvey Bradshaw Schweregrad Index für MC

Kategorie des HBSI	Punktzahl des HBSI
Generelles Wohlbefinden	0 = sehr gut 1 = leichtes Unwohlsein 2 = dürftig 3 = sehr dürftig 4 = schlecht
abdominelle Schmerzen	0 = keine 1 = milde 2 = gemäßigt 3 = schwerwiegend
Anzahl der unformten Stuhlgänge	Anzahl der Stuhlgänge
abdominelle Resistenzen	0 = keine 1 = undefiniert 2 = definiert 3 = definiert und empfindliche
Komplikationen	1 Punkt pro aufgetretener Komplikation: -Arthralgie -Uveitis -Erythema nodosum -Pyoderma gangraenosum -Aphthen -Analfissur -neue Fisteln -Abszess

Tab. 2: Auflistung zur Bestimmung des modifizierten Truelove Witts Schweregrad Index für CU

Kategorie des MTWSI	Punktzahl des MTWSI
Diarrhoe	0 = 1-2 Diarrhoen/Tag 1 = 3-4 Diarrhoen/Tag 2 = 5-6 Diarrhoen/Tag 3 = 7-9 Diarrhoen/Tag 4 = mehr als 10 Diarrhoen/Tag
nächtliche Diarrhoe	0 = nein 1 = ja
blutiger Stuhlgang	0 = keinen 1 = gelegentlich 2 = bei 50% der Stuhlgänge 3 = bei jedem Stuhlgang
Stuhl Inkontinenz	0 = nein 1 = ja
abdominelle Krämpfe	0 = keine 1 = mild, aber tolerabel 2 = gemäßigt, in Zusammenhang mit Stuhlgang 3 = schwerwiegend
generelles Wohlbefinden	0 = ausgezeichnet 1 = sehr gut 2 = gut 3 = ausreichend 4 = dürftig 5 = schlecht
anti-Diarrhoe Medikation	0 = nein 1 = ja
schmerzhafte Bauchdecken Abwehrspannung	0 = keine 1 = milde bis gemäßigt, lokalisiert 2 = milde bis gemäßigt, diffus 3 = schwer oder Loslassschmerz

2.2 Antikörper und Reagenzien

2.2.1 Puffer und Medien

10 x PBS (in 1l dest. H₂O):

- 137 mM NaCl (Merck, Darmstadt)
- 2,7 mM KCl (Merck, Darmstadt)
- 4,3 mM Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt)
- 1,4 mM KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt)

PBA (in PBS):

- 0,05% BSA (Sigma Aldrich, Taufkirchen)
- 0,1% Azid (Sigma Aldrich, Taufkirchen)

MACS-Puffer (in PBS):

- 0,4% 0,5 M EDTA (Sigma Aldrich, Taufkirchen)
- 0,5% FCS inaktiviert (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe)

PBS/BSA (in PBS):

- 0,05% BSA (Sigma Aldrich, Taufkirchen)
- pH 7,4

Medium zur Kultur dendritischer Zellen:

- RPMI 1640 mit L-Glutamin (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe)
- FCS (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe)
- 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe)
- 1% Pyruvat (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe)

Waschpuffer:

- HBSS (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe)

- 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe)
- 0,2% Gentamycin
- 0,4% Fungizone (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe)

Mukosa-Verdauungsmix:

- Waschpuffer
- Kollagenase (Serva, Heidelberg)
- DNase (Roche, Mannheim)

2.2.2 Kulturzusätze

- LPS (Calbiochem, Darmstadt)
- CpG 2006 (TIB Molbiol Berlin)
- Penicillin/Streptomycin (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe)
- Antimycotic/Antibiotic (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe)

2.2.3 Antikörper

Zellseparation

Kits	Hersteller	
Anti-BDCA-4 (CD304) Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach	
Anti-BDCA-1(Cd1c) Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach	
AK	Spezies	Hersteller
Anti-CD14 Beads	human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-CD3 Beads	human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-CD45 Beads	human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Durchflusszytometrie

AK	Spezies	Hersteller
Anti-BDCA-2 (CD303)	human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-BDCA-1 (CD1c)	human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-BDCA-3 (CD141)	human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-CD123	human	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-HLA-DR	human	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD45RA	human	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD4	human	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD11c	human	BD Pharmingen, Heidelberg

Anti-CD14	human	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD19	human	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD1a	human	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD40	human	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD83	human	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD80	human	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD86	human	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD62L	human	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD49d (alpha4-Integrin)	human	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-beta7 Integrin	human	BD Pharmingen, Heidelberg

Zytokinmessung

Kits	Hersteller
Inflammation CBA Kit	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

2.2.4 Weitere Reagenzien

- Propidium Jodid 0,1 µg/ml (Calbiochem, Darmstadt)
- Trypan Blau (Sigma Aldrich, Taufkirchen)
- DTE (Dithioerythrol, Sigma Aldrich, Taufkirchen)

2.2.5 Geräte

- FACS Calibur (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)
- Eppendorf Zentrifuge 5810R (Eppendorf, Hamburg)
- Inkubationsschüttler (Edmund Bühler GmbH, Tübingen)

2.3 Zellisolation

2.3.1 Isolation von peripheren monozytären Blutzellen

Die Isolation der peripheren monozytären Blutzellen (PBMC) erfolgte aus Leukozytenfiltern und aus heparinisiertem peripherem venösem Blut (83).

Kurz zusammengefasst wurde das Vollblut unter sterilen Bedingungen abgenommen und anschließend mit MACS-Puffer 1:2 verdünnt. Die Mischung wurde auf eine in einem Falcon-Röhrchen (BD, Pharmingen, Heidelberg) vorgelegte Ficoll-Lösung (Ficoll-Paque Plus, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) pipettiert. Das Volumen der vorgelegten Ficoll-Lösung sollte hierbei 2 ml weniger als das darauf pipettierte Blut-Puffer Gemisch betragen.

Die Leukozytenfilter wurden mit MACS-Puffer entgegen der Flussrichtung des Spenderblutes durchgespült. Die dadurch gewonnene Suspension wurde ebenfalls auf eine vorgelegte Ficoll-Lösung pipettiert, deren Volumen 2 ml geringer als die Suspension war.

Anschließend wurde die Ficoll-Lösung 20 Minuten bei Raumtemperatur, ohne Bremse zentrifugiert. Durch die Dichtezentrifugation bildete sich eine Interphase, die die peripheren monozytären Zellen enthielt. Sie wurde abpipettiert und in ein Falcon-Tube überführt. Die Zellen wurden zweimal mit MACS-Puffer gewaschen (zehnfacher Pufferüberschuss) und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch gezählt. Es wurden hierbei nur vitale Zellen gezählt. Die Identifikation toter Zellen erfolgte durch Anfärben mit einer Trypanblaulösung (Sigma Aldrich, Taufkirchen).

2.3.2 Aufbereitung der Zellen aus humanem Darmgewebe

Die Isolation lymphozytärer Zellen aus der Lamina Propria erfolgte aus humanem Darmgewebe von Darmresektaten. Auch hier wurde nach bereits bekanntem Protokoll zur Zellisolation aus humaner Mukosa gearbeitet (84).

Die Gewebestücken wurden zunächst mit Pinzette und Schere von Fett befreit und anschließend die Mukosa-Schicht vorsichtig abgetrennt. Die Mukosastücke wurden dann in einer Lösung aus HBSS (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe) und DTE (Sigma Aldrich,

Taufkirchen) 10 min geschüttelt, um die luminale Mukusschicht von der Mukosa zu entfernen. Danach wurde die Mukosa noch mal für weitere 10 min in Wasch-Puffer geschüttelt.

Die Epithelschicht konnte nach dem Waschen mit zwei Glas Objektträgern von der Mukosa abgeschabt werden.

Die Mukosa wurde anschließend in möglichst kleine Stücke zerschnitten und in 15 ml des Mukosa-Verdauungsmix gegeben. Die Gewebestücke wurden nun in einem Inkubationsschüttler (E.Bühler GmbH, Tübingen) 90-120 Minuten inkubiert.

Nach dem Verdau wurde die Gewebesuspension über Falcon Filter (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg) gegeben, um eine bessere Feinheit der Suspension zu gewährleisten.

Die Zellen wurden anschließend zweimal mit MACS-Puffer gewaschen und für die nachfolgende Zellseparation in MACS-Puffer in Lösung gebracht.

2.3.3 Magnetische Zellseparation

Das Prinzip der magnetischen Zellseparation beruht auf der Inkubation von Zellen mit für den jeweiligen Zelltyp spezifischen Antikörpern, die mit Mikrobeads gekoppelt und dadurch markiert sind. Die Zellen werden anschließend über Säulen gegeben, die sich in einem Magnetfeld befinden. Die markierten Zellen können dabei mit Hilfe des Magnetfeldes aussortiert werden. Die Isolation der DC wurde nach Packungsbeilage der entsprechenden Isolationskits durchgeführt.

2.3.3.1 Zellseparation aus venösem Blut PBMC

Zur Isolation der PDC wurde ein mit Beads gekoppelter anti-BDCA-4 Antikörper (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) benutzt. Dieser wurde zusammen mit der Zelllösung, MACS-Puffer und FCR-Blocking Reagenz (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) 15 Minuten lang bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und über eine MS-Magnet-Säule (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) gegeben. Bei einer Zellzahl größer 10x7 Zellen wurde anstatt mit MS-Magnet-Säulen mit LS-Magnet-Säulen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) gearbeitet.

Die sortierten positiven Zellen wurden nun mit einem Stempel durch die Säule gedrückt und aufgefangen. Um eine möglichst reine Fraktion zu erhalten, wurde dieser Vorgang in einer zweiten Säule wiederholt.

Zur Isolation der MDC-1 Population aus Blut PBMC wurde ebenfalls die Methode der magnetischen Separation genutzt. Wie in der Packungsbeilage vorgeschrieben wurden die PBMC mit anti-BDCA-1 (CD1c)-Biotin Antikörpern (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), FCR-Blocking Reagenz (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), MACS-Puffer und anti-CD19 Mikrobeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) 15 min lang bei 4°C inkubiert.

Die anti-CD19 Beads wurden benötigt, um die PBMC vor der magnetischen Separation von B-Zellen zu depletieren, welche im peripheren Blut ebenfalls CD1c exprimieren können. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und über eine LD-Magnet-Säule (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) gegeben, um so die markierten B-Zellen auszusortieren. Die durchlaufenden Zellen wurden aufgefangen, gewaschen und dann mit MACS-Puffer und den anti-Biotin Beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) bei 4°C 15 min inkubiert.

Somit wurden die anti-BDCA-1 (CD1c) Antikörper mit Beads versehen, und die Suspension konnte nach einem weiteren Waschschrift über MS-Magnet-Säulen gegeben werden. Dabei wurden die MDC im Magnetfeld zurück gehalten und konnten anschließend aus der Säule eluiert werden.

2.3.3.2 Zellseparation aus lymphozytären Zellen der Darmmukosa

Zur Isolation von lymphozytären Zellen aus der Mukosa-Zell-Suspension wurden die Zellen nach dem Verdau zweimal gewaschen.

Vor der Färbung von Oberflächen Markern auf lymphozytären Mukosa Zellen wurden die CD45 positiven (lymphozytären) Zellen angereichert. Dazu wurde die Zellsuspension zusammen mit anti-CD-45 Beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) 15 min bei 4°C inkubiert, gewaschen und anschließend über eine LS-Magnet-Säule (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) gegeben. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen aus der Säule eluiert und im Anschluss zur FACS-Messung eingesetzt.

2.3.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Differenzierung von in Suspension befindlichen Zellen nach deren morphologischen Eigenschaften (Zellgröße und Granularität) und Fluoreszenz. Dies geschieht durch Bindung von zellspezifischen, mit Fluorochrom markierten Antikörpern an Antigene.

Im Rahmen der Zellseparation wurde anhand der Durchflusszytometrie die Reinheit der isolierten Zellpopulationen überprüft.

Die Analyse der Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer FACS-Calibur (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg) durchgeführt. Hierfür wurden vor und nach jeder Zellisolation (100 µl) der Suspension entnommen und mit den entsprechenden zellpopulationsspezifischen AK 15 min bei 4°C inkubiert, anschließend gewaschen und in 500µl PBA zur Messung resuspendiert. Zusätzlich wurde 1% einer 0,1 µl/mg Propidium Jodid Lösung (Calbiochem, Darmstadt) zu der Suspension gegeben, um die toten Zellen bei der Messung abgrenzen zu können.

PDC wurden mit anti-BDCA-2 FITC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) und anti-CD-123 PE (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg) markiert.

Die Identifikation der MDC-1 erfolgte über anti-BDCA-1 (CD1c) FITC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) und anti-CD11c PE (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg). Zusätzlich wurden Marker für Monozyten, Granulozyten und B-Zellen verwendet, um die entsprechenden Zellen am FACS ausgrenzen zu können, da eine Kreuzreaktivität des anti-BDCA-1 (CD1c) und des anti-CD11c Antikörpers mit B-Zellen und Monozyten besteht.

Die Zellen wurden mit anti-CD14 PerCP und anti-CD19 Cychrome (BD Pharmingen Biosciences, Heidelberg) und den MDC-1 Antikörpern anti-CD11c (BD Pharmingen Biosciences, Heidelberg) und anti-BDCA-1 (CD1c) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) für 15 min inkubiert.

Die Identifikation der MDC-2 erfolgte über anti-BDCA-3 (CD141) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach).

2.4 Messung von Charakterisierungsmarkern dendritischer Zellen

2.4.1 Messung von Reife- und Aktivierungsmarkern

Die isolierten PBMC aus venösem Blut wurden mit Hilfe der spezifischen Marker für DC gefärbt. Zusätzlich wurde eine Färbung mit Markern, die spezifisch für den Reifegrad und Aktivierungszustand (anti-CD1a, anti-CD40, anti-CD83, anti-CD80, anti-CD86) der Zellen sind, an den Zellen vorgenommen.

Die jeweiligen Antikörper wurden mit den Zellen 15 min bei 4°C inkubiert, anschließend einmal gewaschen und dann durchflusszytometrisch gemessen.

Es konnten so am Durchflusszytometer die Populationen der DC identifiziert und gleichzeitig auf entsprechendes Vorhandensein von Oberflächenmarkern für Reifegrad und Aktivierungszustand untersucht werden.

2.4.2 Messung von Migrationsmarkern

Migrationsmarker (anti-CD62L und Alpha4-beta7-Integrin (CD49d)) für DC wurden ebenfalls gemessen. Die Zellen wurden hier ebenfalls mit den typischen Markern für PDC und MDC gefärbt und zusätzliche Färbungen für Migrationsmarker vorgenommen.

Die spezifischen Antikörper wurden für 15 min bei 4°C mit den Zellen inkubiert und nach einem Waschschrift durchflusszytometrisch gemessen.

2.5 Kultur dendritischer Zellen

2.5.1 Messungen des Zytokinmusters von MDC nach Aktivierung

Zur Bestimmung der Zytokinproduktion dendritischer Zellen wurden diese unter Einfluss von Stimulanzen nach erfolgter Isolation und Reinheitsprüfung in Kultur genommen.

Die Zellen wurden in 96-Well Flat-Bottom Zellkulturplatten (Corning Incorporated, New York, USA) vorgelegt und durch Zugabe von Medium und Kulturzusätzen auf jeweils 150 µl aufgefüllt.

Die MDC wurden mit LPS (Calbiochem, Darmstadt) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ für 20 h in Kultur genommen.

Nach Ende der 20 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit Medium aus den Wells geerntet, mit 582g zentrifugiert und anschließend vorsichtig die Überstände abgenommen. Die Überstände der DC konnten nun bis zur Analyse im Gefrierschrank bei -80°C aufbewahrt werden.

2.5.2 Messung der Zytokinproduktion

Zur Messung der Zytokinproduktion in den Überständen der MDC Populationen wurde das Human Inflammation CBA Kit (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Cat.No.551811) verwendet. Das Kit ermöglicht die gleichzeitige quantitative Analyse mehrerer Zytokine in Zellkulturüberständen. Gemessen wurden die Zytokine Interleukin-1β, Interleukin-6, Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor und Interleukin-12p70.

Die Färbungen und Analysen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Beim CBA werden Antikörper Beads mit abgestuften Mengen eines fluoreszierenden Farbstoffs markiert. Durch die verschiedenen Intensitäten des Farbstoffs können bei der späteren durchflusszytometrischen Analyse die unterschiedlichen Zytokin-Antikörper unterschieden werden.

Durch Inkubation der Zytokin-Antikörpern gekoppelten Beads zusammen mit den zellfreien Überständen der Kultur und einem Fluorochrom (PE) Reagenz für 3 Stunden im Dunkeln bei RT bildet sich eine Art Sandwich Komplex. So kann anhand des gebundenen

Farbstoffs (PE) später die Menge der jeweils in den Überständen vorhandenen Zytokine durchflusszytometrisch registriert werden.

Die Proben wurden anschließend in 1ml Wasch-Puffer (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg) bei 200g 5 min zentrifugiert. Für die durchflusszytometrische Messung wurden die Proben in 300 µl resuspendiert.

Die absolute Zytokinmenge wurde anschließend über Kalibrierkurven (Zytokinstandards des Herstellers) ermittelt und mit Hilfe der CBA Analysis Software (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg) grafisch und tabellarisch ausgewertet.

2.5.3 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse und Darstellung der Graphen wurde durchgeführt mit der Software SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, USA). Als signifikant wurde ein Wert von mindestens $p < 0,05$ festgelegt. Zur Berechnung der Signifikanzen wurde der Mann-Whitney *U* test und der T-Test herangezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Dendritische Zellen von CED Patienten zirkulieren vermindert im peripheren Blut

In der vorliegenden Arbeit wurde das Blut von 95 Probanden untersucht (n=34 für MC, n=39 für CU, n=22 für gesunde Probanden).

Die Einteilung der Patienten bezüglich ihrer Erkrankungsaktivität erfolgte mit Hilfe des modifizierten Truelove-Witts Index (MTWSI) für CU Patienten und dem Harvey-Bradshaw Index (HBSI) für MC Patienten.

CU Patienten, mit einem MTWSI von größer gleich 10, und MC Patienten, mit einem HBSI-Wert größer gleich 7, wurden als Patienten, die sich im akuten Entzündungsstadium befanden, eingestuft.

3.1.1 Quantifizierung dendritischer Zellen im peripheren Blut

Im Blut von CED Patienten und gesunden Probanden wurden Messungen zur Quantifizierung der MDC als auch PDC-Population an PBMC vorgenommen.

Verglichen mit gesunden Probanden zeigten Patienten im Entzündungsstadium, und vor allem im akuten Schub, eine stark reduzierte Anzahl an dendritischen Zellen im peripheren Blut.

Die dargestellten Daten sind ausgewählte repräsentative graphische Darstellungen (Plots) der FACS-Messungen. Die Gates (Messgrenzen) wurden zuvor durch Isotypen Messungen festgelegt. Im rechten oberen Quadranten jeweils zu sehen die Population der doppelt positiven Zellen, entsprechend den PDC (CD123 und BDCA-2 positiv) und MDC (CD11c und BDCA-1 positiv).

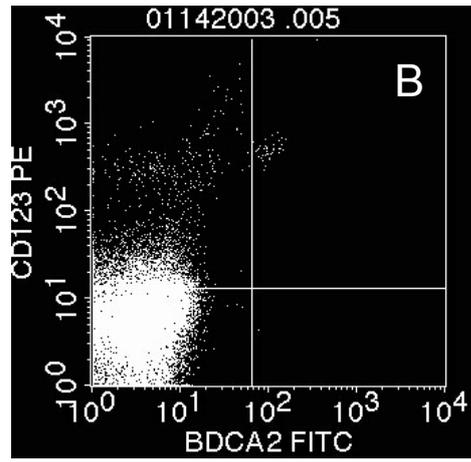
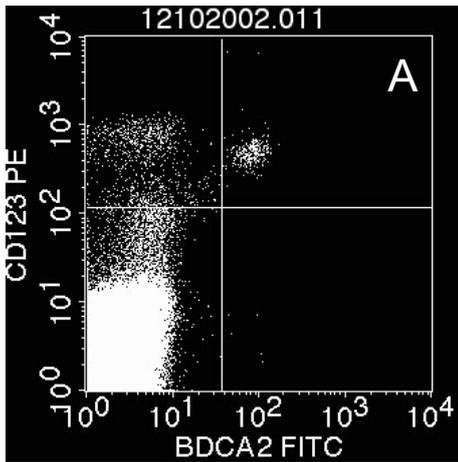


Abbildung 5: PDC von CU Patienten in Remission 0,66%(A) und im akuten Schub 0,06%(B)

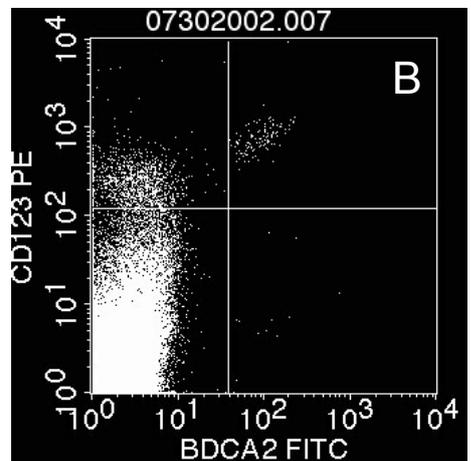
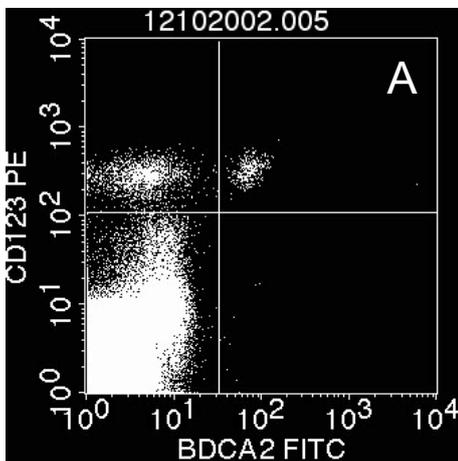


Abbildung 6: PDC von MC Patienten in Remission 0,31%(A) und im akuten Schub 0,12%(B)

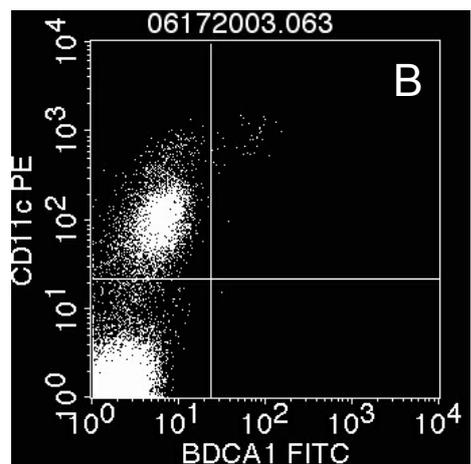
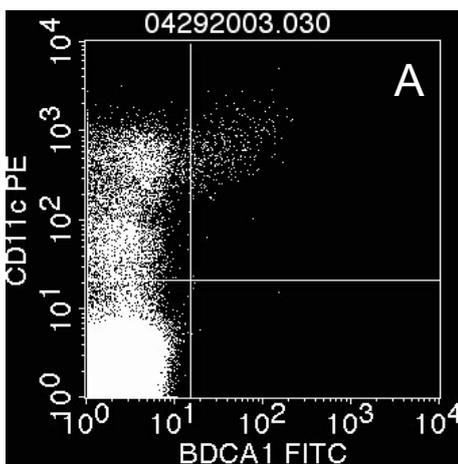


Abbildung 7: MDC von CU Patienten in Remission 0,33%(A) und im akuten Schub 0,17%(B)

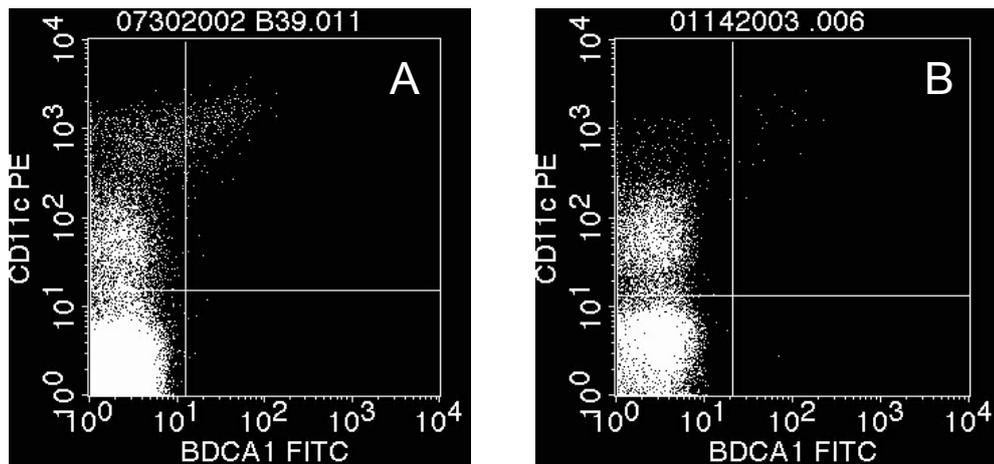


Abbildung 8: MDC von MC Patienten in Remission 0,23%(A) und im akuten Schub 0,06%(B)

In der Population der PDC zeigten sich bei den CU Patienten in Remission im Mittel $0,39 \pm 0,08$ (SE) % PDC von PBMC im peripheren Blut, wohingegen im Schub nur $0,08 \pm 0,017$ (SE) % PDC von PBMC nachgewiesen werden konnten. Der gemessene Unterschied war statistisch signifikant ($p \leq 0,001$).

Bei den MC Patienten zeigten sich ähnliche Tendenzen. Bei Patienten in Remission wurden im Mittel $0,37 \pm 0,045$ (SE) % PDC von PBMC im peripheren Blut gemessen, im Schub dagegen nur $0,18 \pm 0,028$ (SE) % PDC von PBMC. Auch hier zeigte sich eine statistische Signifikanz ($p < 0,01$).

Gesunde Kontrollen wiesen im Mittelwert $0,48 \pm 0,11$ (SE) % PDC aller PBMC auf.

Im Vergleich der gesunden Kontrollen mit den Patienten in Remission konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen gemessen werden.

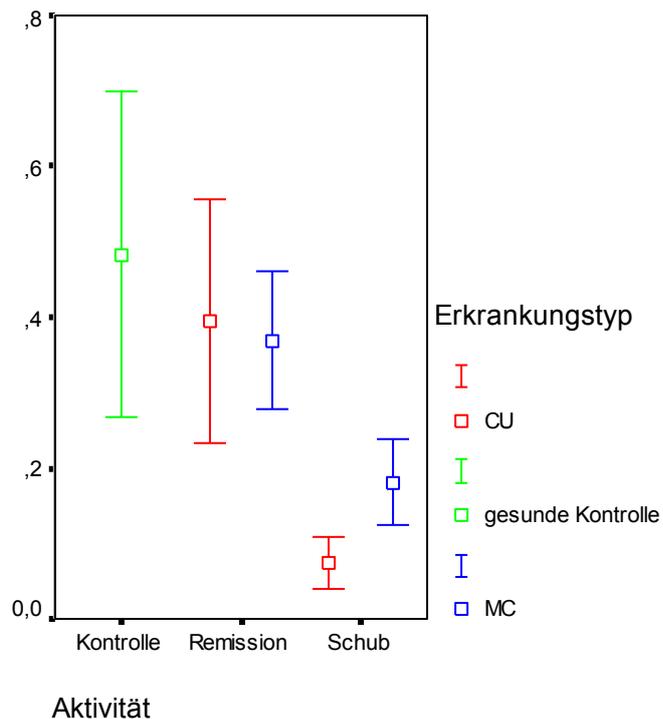


Abbildung 9: Grafische Darstellung der gemessenen PDC Populationen bei Kontrollen, CU/MC Patienten in Remission und im Schub

Auch in der Population der MDC-1 zeigten sich prozentual weniger DC bei den CED Patienten im Schub als bei CED Patienten in Remission. Statistische Signifikanzen konnten allerdings nur bei den CU Patienten gemessen werden ($p < 0,001$). Im Vergleich zwischen den gesunden Kontrollen und CED Patienten in Remission konnten keine Veränderungen bezüglich der Zellzahl festgestellt werden.

CU Patienten in Remission zeigten im Mittel $0,20 \pm 0,023$ (SE) % MDC-1 der PBMC, im Schub dagegen nur $0,09 \pm 0,01$ (SE) % MDC-1 der PBMC. MC Patienten in Remission zeigten im Mittel $0,21 \pm 0,02$ (SE) % MDC-1 von PBMC, im Schub dagegen nur $0,19 \pm 0,019$ (SE) % MDC-1 der PBMC.

Gesunde Kontrollen wiesen im Mittelwert $0,21\% \pm 0,01$ (SE) % MDC-1 aller PBMC auf.

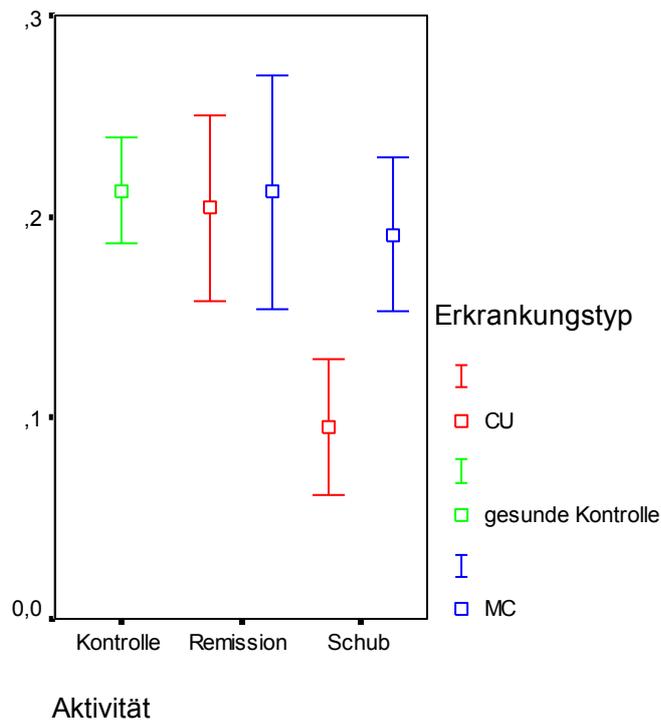


Abbildung 10: Grafische Darstellung der gemessenen MDC-1 Populationen bei Kontrollen, CU/MC Patienten in Remission und im Schub

Zuletzt wurden noch Messungen an der Population der MDC-2 des peripheren Blutes vorgenommen. Auch hier konnte eine Verminderung der DC im Schub gezeigt werden. Die gezeigten Ergebnisse waren jedoch in den Auswertungen nicht statistisch signifikant. CU Patienten in Remission zeigten im Mittel $0,025 \pm 0,009$ (SE) % MDC-2 der PBMC, im Schub dagegen nur $0,01 \pm 0,00$ (SE) % MDC-2 aller PBMC.

MC Patienten in Remission zeigten im Mittel $0,02 \pm 0,00$ (SE) % MDC-2 der PBMC, im Schub dagegen ebenfalls nur $0,01\% \pm 0,00$ (SE) % MDC-2 von PBMC.

Gesunde Kontrollen wiesen im Mittelwert $0,025 \pm 0,01$ (SE) % MDC-2 aller PBMC auf.

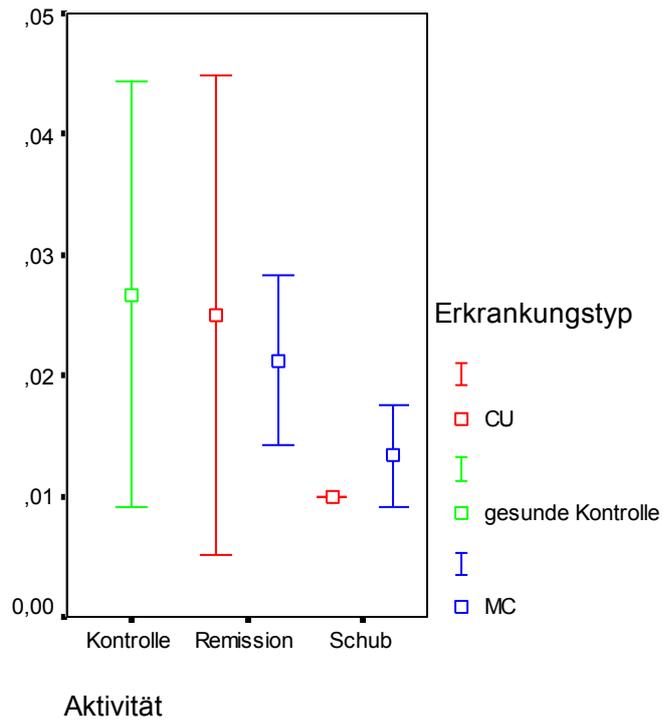


Abbildung 11: Grafische Darstellung der gemessenen MDC-2 Populationen bei Kontrollen, CU/MC Patienten in Remission und im Schub

In den weiteren Experimenten wurde auf Grund der geringen Fallzahlen und somit fehlender Aussagekraft mit einer hohen Fehlermöglichkeit auf weitere Messungen an MDC-2 verzichtet.

3.1.2 Phänotypisierung dendritischer Zellen im peripheren Blut von CED Patienten

Anhand der vorherigen Experimente konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl dendritischer Zellen im peripheren Blut von CED Patienten im Entzündungsstadium verringert. Weitere Messungen von Oberflächenmarkern sollten zeigen, ob sich der Phänotyp dendritischer Zellen im Rahmen dieses Zellverlustes ebenfalls verändert.

Die dendritischen Zellen (Population der PDC und MDC-1) wurden auf folgende Marker untersucht:

HLA-DR Klasse II, CD 62L, CD86, CD80, CD40, CD83(RI) und CD1a.

HLA-DR Klasse II konnte im Verlauf der Messungen sowohl auf PDC und MDC-1 der Kontrollen, als auch auf PDC und MDC-1 von Patienten in Remission und im Schub nachgewiesen werden. Im Folgenden dargestellt in repräsentativen Plots der Messungen.

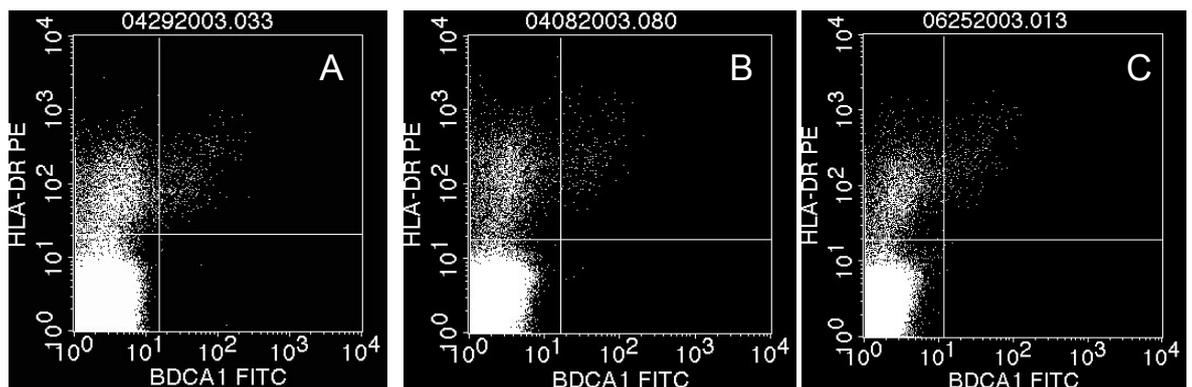


Abbildung 12: HLA-DR Messungen an MCD-1 von CU Patienten in Remission 99,26% (A), im Schub 93,78% (B) und gesunder Kontrollen 99,8 % (C); die genannten Prozentzahlen beziehen sich jeweils nur auf die BDCA-1 positiven Zellen

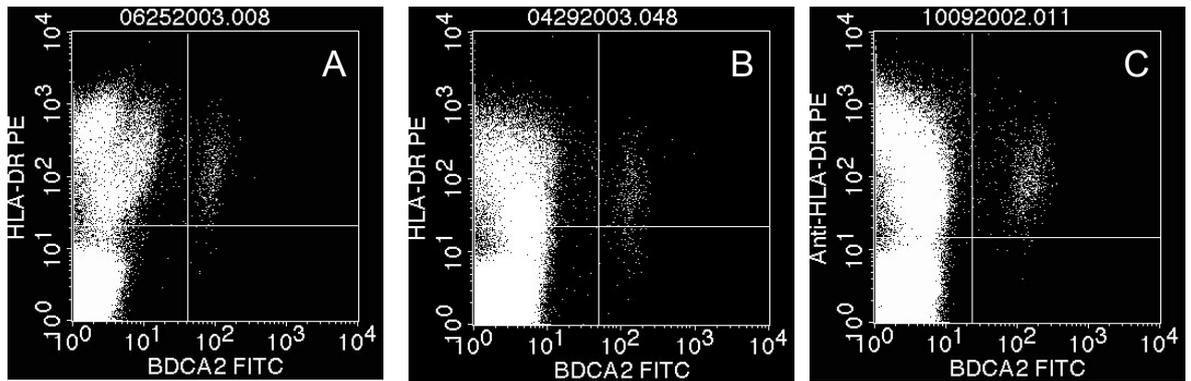


Abbildung 13: HLA-DR Messungen an PDC von MC Patienten in Remission 94,4% (A), im Schub 91,4% (B) und gesunder Kontrollen 98,66% (C); die genannten Prozentzahlen beziehen sich jeweils nur auf die BDCA-2 positiven Zellen

Eine Tendenz die hier zu beobachten war, ist die leicht verminderte Expression von HLA-DR bei Patienten im akuten Schub.

CD62L, ein Zell Adhäsionsmolekül aus der Gruppe der C-Typ Lectine, deren Aufgabe im Rahmen der Leukozytenwanderung in entzündetes Gewebe bereits beschrieben wurde (85) konnte auf peripheren TC Populationen nachgewiesen werden die in den Lymphknoten wandern (86). Dieses Adhäsionsmolekül konnte auch auf den DC Populationen unserer Experimente nachgewiesen werden.

Hier zeigte sich vor allem die Population der PDC für CD62L deutlich positiv.

Es konnten allerdings keine Unterschiede in der Expression dieses Oberflächenantigens im Vergleich zwischen Patienten und Gesunden festgestellt werden.

Als repräsentatives Beispiel im Folgenden einmal gezeigt in FACS-Plots von MDC-1 Zellen gesunder Probanden im Vergleich zu Patienten mit CU im Schub und in Remission (Abbildung 14) und PDC Zellen gesunder Probanden im Vergleich zu Patienten mit MC im Schub und in Remission (Abbildung 15).

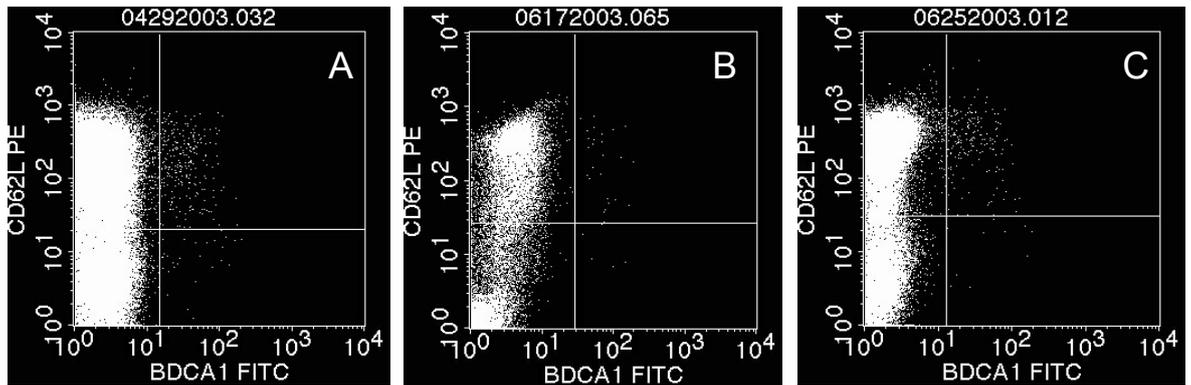


Abbildung 14: CD62L Messungen an MDC-1 von CU Patienten in Remission 93,23% (A), im Schub 91,8% (B) und gesunder Kontrollen 98,01%(C); die genannten Prozentzahlen beziehen sich jeweils nur auf die BDCA-1 positiven Zellen

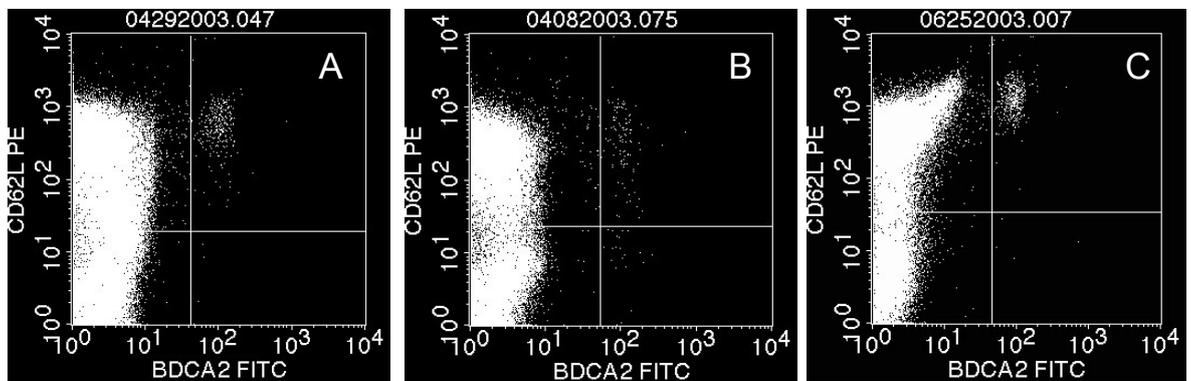


Abbildung 15: CD62L Messungen an PDC von MC Patienten in Remission 98,9% (A), im Schub 91,9% (B) und gesunder Kontrollen 99,7% (C); die genannten Prozentzahlen beziehen sich jeweils nur auf die BDCA-2 positiven Zellen

CD86 ist ein Oberflächenantigen, das eine wichtige Rolle in der Kostimulation von TC bei der primären Immunantwort spielt (87). Es wurde verglichen mit Referenzwerten gesunder Probanden, nicht vermehrt auf DC von CED Patienten im Entzündungsstadium nachgewiesen, konnte jedoch sowohl auf den gemessenen PDC und auch MDC-1 Populationen in geringem Masse nachgewiesen werden. Die Population der PDC zeigte sich hierbei deutlich weniger positiv für CD86.

Im folgendem einmal gezeigt als FACS-Plots am Beispiel von MDC-1 Zellen gesunder Probanden im Vergleich zu Patienten mit CU im Schub und in Remission (Abbildung 16) und PDC Zellen gesunder Probanden im Vergleich zu Patienten mit MC im Schub und in Remission (Abbildung 17).

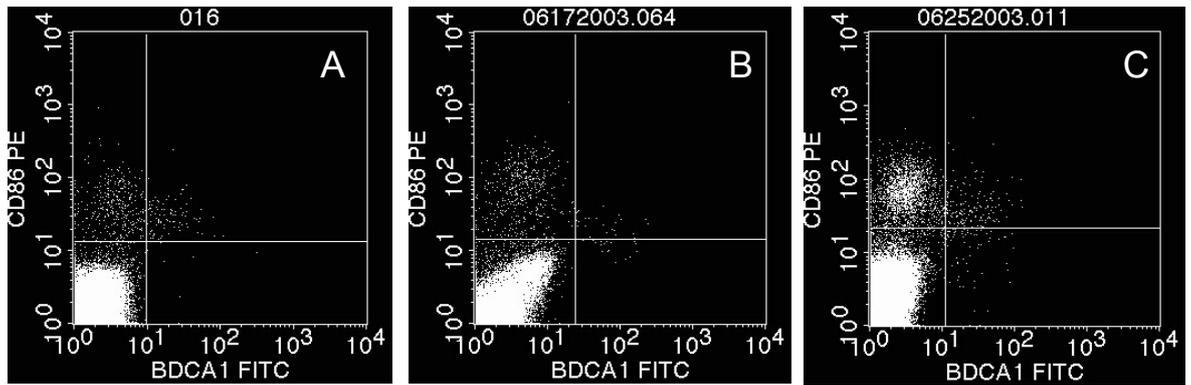


Abbildung 16: CD86 Messungen an MDC-1 von CU Patienten in Remission 91,1% (A), im Schub 86,0% (B) und gesunder Kontrollen 87,17% (C); die genannten Prozentzahlen beziehen sich jeweils nur auf die BDCA-1 positiven Zellen

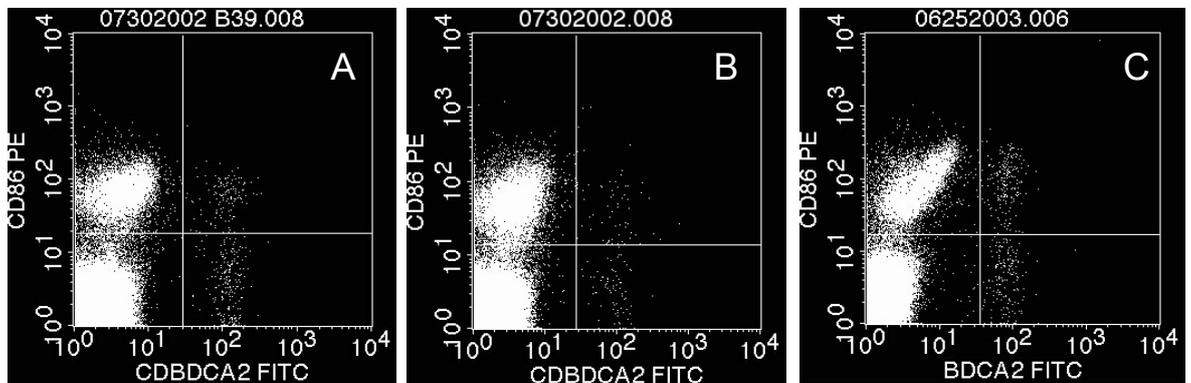


Abbildung 17: CD86 Messungen an PDC von MC Patienten in Remission 44,10% (A), im Schub 49,32% (B) und gesunder Kontrollen 52,61% (C); die genannten Prozentzahlen beziehen sich jeweils nur auf die BDCA-2 positiven Zellen

Die anderen Marker, die im Rahmen der Experimente zur Phänotypisierung der DC gemessen wurden, Oberflächenmarker CD80, CD40, CD83 und CD1a, welche alle eine wichtige Rolle beim Vorgang der Antigenpräsentation und TC Proliferation spielen, konnten, auf den DC der gemessenen CED Patienten und Probanden, unter den aktuellen experimentellen Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Daten hierzu werden deshalb nicht aufgeführt.

3.2 Dendritische Zellen von CED Patienten akkumulieren in der intestinalen Mukosa

3.2.1 Nachweis von „homing Markern“ auf dendritischen Zellen

Die Tatsache, dass CED Patienten im Entzündungsstadium und im akuten Schub eine geringere Anzahl an DC im peripheren Blut aufwiesen, führte zu Untersuchungen, die sich näher mit der Lokalisation und Wanderung dendritischer Zellen im Rahmen der Entzündungsvorgänge befassten.

Es wurden Oberflächenmarker untersucht, die eine wichtige Rolle bei der Migration von Leukozyten spielen (85). Gemessen wurde Alpha4 (CD49d)- und beta7-Integrin, ein Marker der vor allem im Bereich des „Gut homing“ eine wichtige Rolle spielt.

Hierfür wurden 3-fach-Färbungen an PBMC durchgeführt. Bei der Auswertung der Messungen wurde auf die unterschiedlichen DC Populationen gated und dann die Doppelfärbung CD49d (alpha4) gegen Integrin beta7 separat dargestellt.

Die gemessenen Subpopulationen dendritischer Zellen (PDC und MDC-1) von CED Patienten im Entzündungsstadium zeigten sich in der Doppelfärbung CD49d (alpha4) gegen Integrin beta7 als doppelt positiv. Hier dargestellt am Beispiel dendritischer Zellen eines MC Patienten (Abbildung 18).

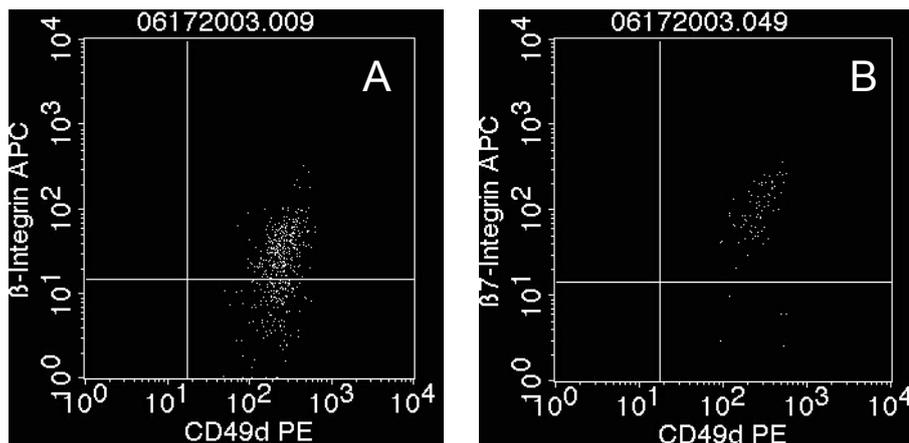


Abbildung 18: Darstellung der PDC 67,1% (A) und MDC-1 93,6% (B) Populationen für den Migrationsmarker Alpha4-beta7-Integrin am Beispiel eines MC-Patienten

Im Rahmen der Messungen konnten festgestellt werden, dass alle gemessenen DC Population der an CED erkrankten Patienten bezüglich CD49d positiv waren. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass vor allem die Populationen der MDC-1 zugleich doppelt positiv für Alpha4- und beta7-Integrin waren, wohingegen die PDC weniger beta7-Integrin positive Zellen zeigten.

Im Gegensatz dazu zeigten sich bei Messungen an DC von gesunden Probanden deutlich weniger Zellen, sowohl bei den MDC-1 als auch bei den PDC doppelt positiv für Alpha4-beta7-Integrin. Hier wiederum dargestellt anhand einer repräsentativen Beispiel Messung an PDC und MDC-1 eines gesunden Probanden (Abbildung 19).

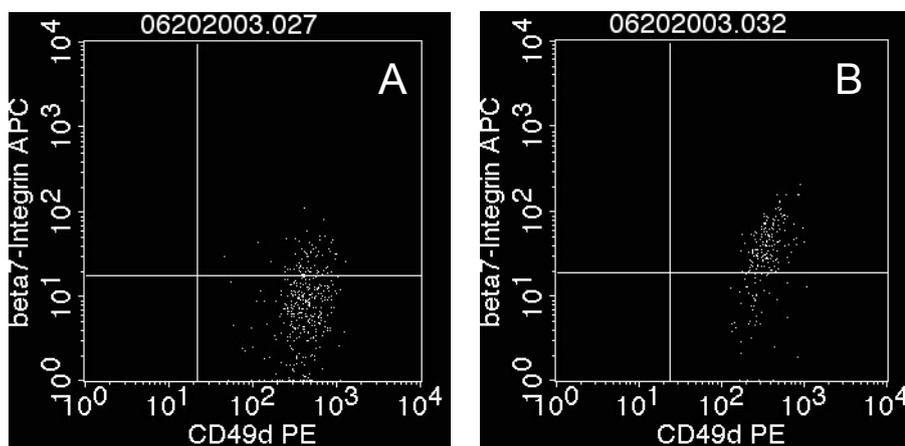


Abbildung 19: Darstellung der PDC 18,78% (A), der MDC-1 76,17% (B) Populationen für den Migrationsmarker Alpha4-beta7-Integrin am Beispiel eines gesunden Probanden

Insgesamt wurde in diesem Experiment die DC von 5 MC Patienten, 5 CU Patienten und 11 gesunde Kontrollprobanden bezüglich doppelt positiver Zellen für Alpha4-beta7-Integrin gemessen. Die gemessenen Daten wurden jedoch nicht weiter statistisch ausgewertet da auf Grund der aktuell vorliegenden geringen Fallzahlen keine statistisch sinnvolle Erhebung möglich erscheint.

Der Nachweis von Migrationsmarkern auf den PDC als auch MDC-1 lässt den Schluss zu dass diese Zellen durch das Vorhandensein von Alpha4-beta7-Integrin fähig sind zu migrieren.

3.2.2 Nachweis dendritischer Zellen in der intestinalen Mukosa

Die Verminderung von DC im peripheren Blut im akuten Schub lässt als Hypothese zu dass DC im Rahmen einer akuten Entzündung zum Ort des Entzündungsgeschehens auswandern, so dass anschließend Messungen an Darmgewebeproben durchgeführt wurden.

Es gelang in Versuchen an humaner Kolon Mukosa DC durchflusszytometrisch nachzuweisen.

Im folgendem dargestellt sind repräsentative Beispiele von Darm-Mukosa-DC Experimenten gesunder und an CED erkrankter Probanden.

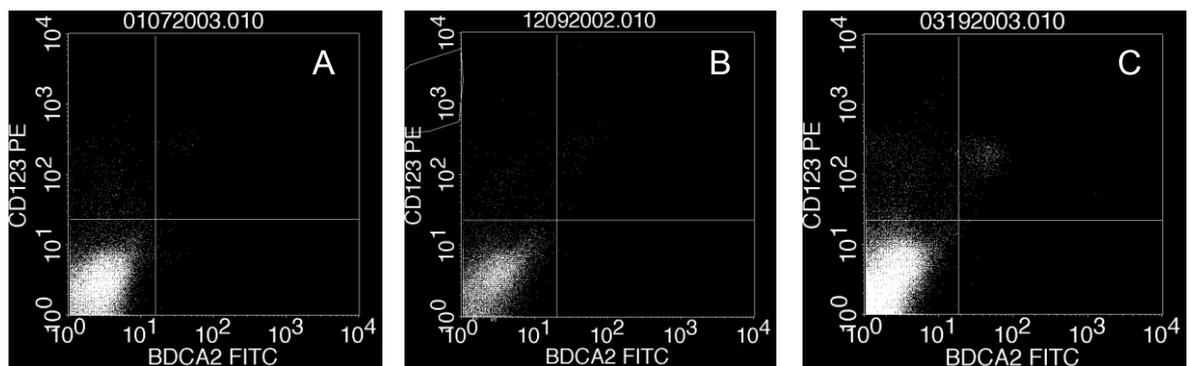


Abbildung 20: PDC Population der CD45+ Darm-Mukosazellen von gesunden Probanden 0,07% (A), MC-Patienten 0,27% (B) und CU-Patienten 0,52% (C)

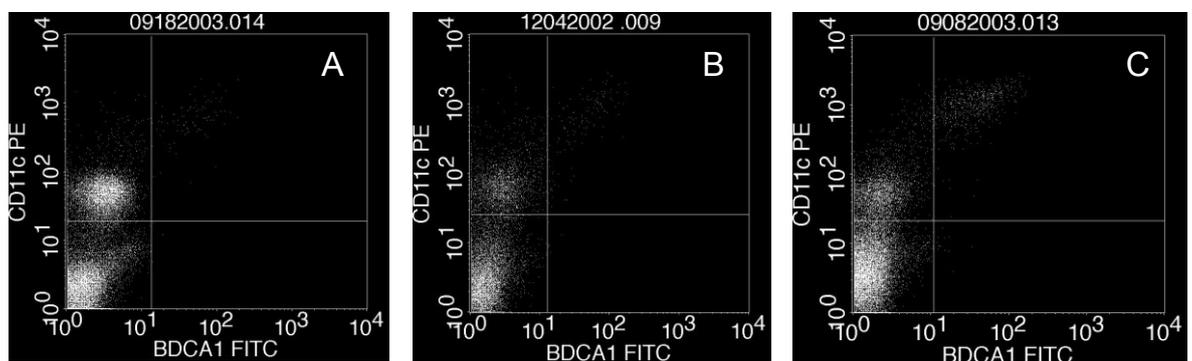


Abbildung 21: MDC-1 Population der CD45+ Darm-Mukosazellen von gesunden Probanden 0,37% (A), MC-Patienten 1,17% (B) und CU-Patienten 2,56% (C)

Es wurden insgesamt Messungen an CD45+ Zellen von 6 CU Patienten, 8 MC Patienten und 18 gesunden Kontrollen vorgenommen.

Die Auswertung der Ergebnisse ergab eine signifikant erhöhte Anzahl an PDC der CD45+ Lamina Propria mononukleäre Zellen (LPMC) im Vergleich zwischen Kontrollen ($0,03 \pm 0,006$ SE) und CU Patienten ($0,55 \pm 0,23$ SE) ($p \leq 0,01$) und im Vergleich zwischen Kontrollen ($0,03 \pm 0,006$ SE) und der Population der MC Patienten ($0,17 \pm 0,04$ SE) ($p \leq 0,01$).

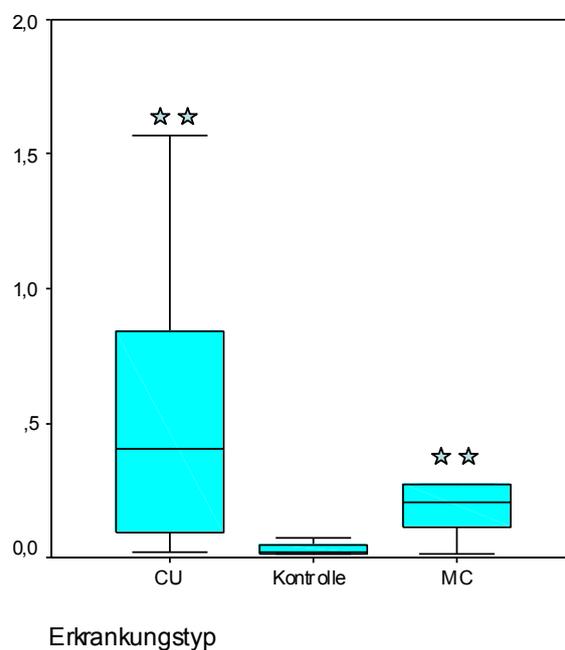


Abbildung 22: Graphische Darstellung (Box-Plots) der PDC Messungen an CD45+Darmmukosazellen

Auch bei den Messungen an MDC-1 konnten in der Darmmukosa von Patienten mit CU und MC vermehrt DC nachgewiesen werden. Hier lag die Zahl der Kontrollen bei $0,24 \pm 0,05$ SE % MDC, wohingegen die CU Patienten im Mittel $0,93 \pm 0,57$ SE % MDC der LPMC und die MC Patienten im Mittel $0,62 \pm 0,17$ SE % MDC der LPMC aufwiesen. Statistische Signifikanz zeigten sich hier allerdings nur im Vergleich der MC Patienten mit den gesunden Kontrollen ($p \leq 0,05$).

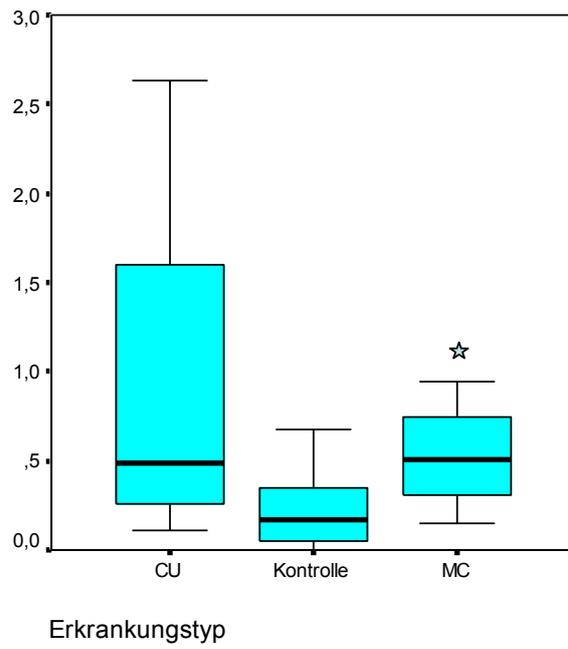


Abbildung 23: Graphische Darstellung (Box-Plots) der MDC Messungen an CD45+Darmmukosazellen

3.3 Funktionelle Untersuchungen an dendritischen Zellen

3.3.1 Stimulationsversuche an dendritischen Zellen (CBA)

Aufbauend auf die obigen Ergebnisse, welche vermuten lassen dass DC in der Phase einer akuten Entzündung in die Entzündungsregion migrieren und vor Ort am Entzündungsgeschehen maßgeblich teilhaben wurden Untersuchungen zur Zytokinproduktion (pro-inflammatorisch) an isolierten DC in Kultur vorgenommen.

Die Versuche wurden zunächst nur an MDC-1 durchgeführt, da nach Isolation der dendritischen Zellen die MDC-1 Reinheitsgrade von mehr als 95% aufzeigen konnten, um sie anschließend in Kultur nehmen zu können, Versuch mit PDC in entsprechenden Reinheitsgraden werden folgen.

Gemessen und ausgewertet wurden die pro-inflammatorischen Zytokine TNFalpha und IL-6. Ohne Stimulation (mit LPS) der Kultur der MDC konnten nach 20 h keine Unterschiede der TNFalpha oder IL-6 Zytokinproduktion im Vergleich zwischen Gesunden Kontrollen und MC oder CU Kranken gemessen werden. Die Werte der einzelnen Gruppen werden nicht einzeln angegeben da sich keine aussagekräftigen Tendenzen zeigen ließen, wie in den beiden folgenden Diagrammen sichtbar.

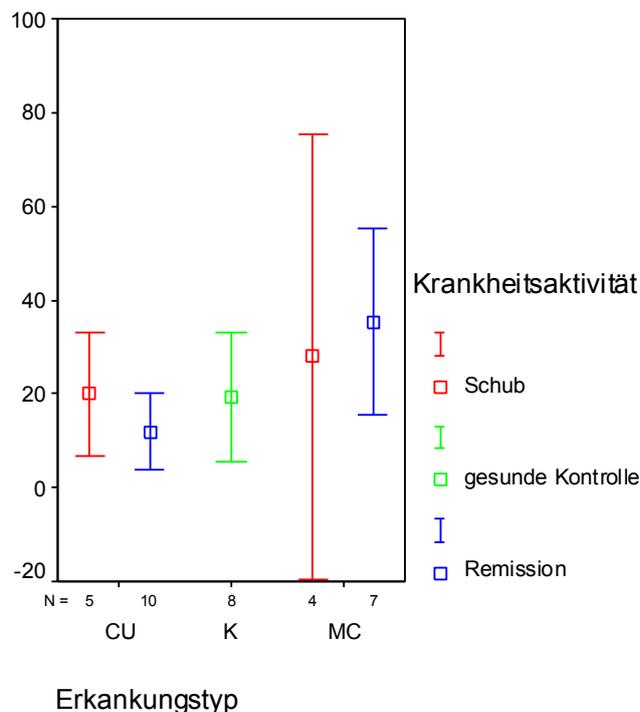


Abbildung 24: TNFalpha Produktion (pg/ml) der MDC-1 Populationen ohne Stimulation mit LPS

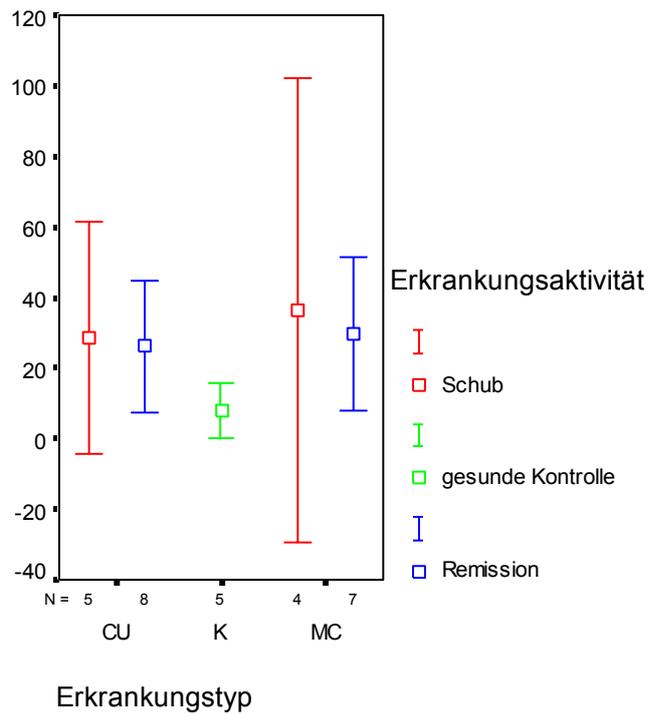


Abbildung 25: IL-6 Produktion (pg/ml) der MDC-1 Populationen ohne Stimulation mit LPS

Nach Stimulation der MDC-1 mit LPS konnten im Vergleich zwischen den gesunden Kontrollen und den MDC-1 der Patienten in Remission sowohl bei CU als auch bei MC signifikant erhöhte TNFalpha Produktion nachgewiesen werden.

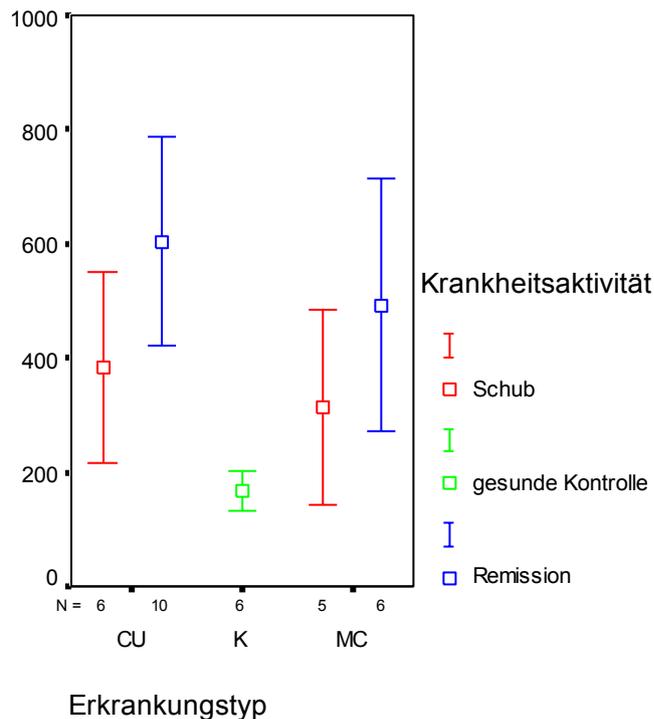


Abbildung 26: TNFalpha (pg/ml) Produktion der MDC-1 nach 20 h Kultur mit LPS

Die durchschnittliche TNFalpha Produktion (Mittelwert) der Kontrollen lag nach Stimulation bei 167,13 pg/ml \pm 17,8 (SE) verglichen mit 603,94 pg/ml \pm 91,5 (SE) der CU Patienten in Remission ($p < 0,01$) und 492,79 pg/ml \pm 110,2 (SE) der MC Patienten in Remission ($p < 0,05$).

Auch im Vergleich der TNFalpha Ausschüttung der gesunden Kontrollen mit den Patienten im akuten Schub (Kontrolle 167,13 pg/ml \pm 17,8 (SE) vs. CU Schub 384,91 pg/ml \pm 83,5 (SE); Kontrolle 167,13 pg/ml \pm 17,8 (SE) vs. MC Schub 314,66 pg/ml \pm 85,2 (SE)) zeigte sich eine deutlich erhöhte TNFalpha Produktion bei den Patienten, jedoch nicht signifikant.

Es zeigte sich interessanterweise zudem, dass die Produktion an TNFalpha durch die MDC-1 der Patienten im akuten Schub vermindert im Vergleich zu denen in Remission lag.

Auch bei den Messungen bezüglich des Zytokins IL-6 konnte nach Stimulation der MDC mit LPS verstärkte Produktion durch die MDC-1 der Patienten, sowohl CU als auch MC in Remission im Vergleich zu den gesunden Kontrollen nachgewiesen werden.

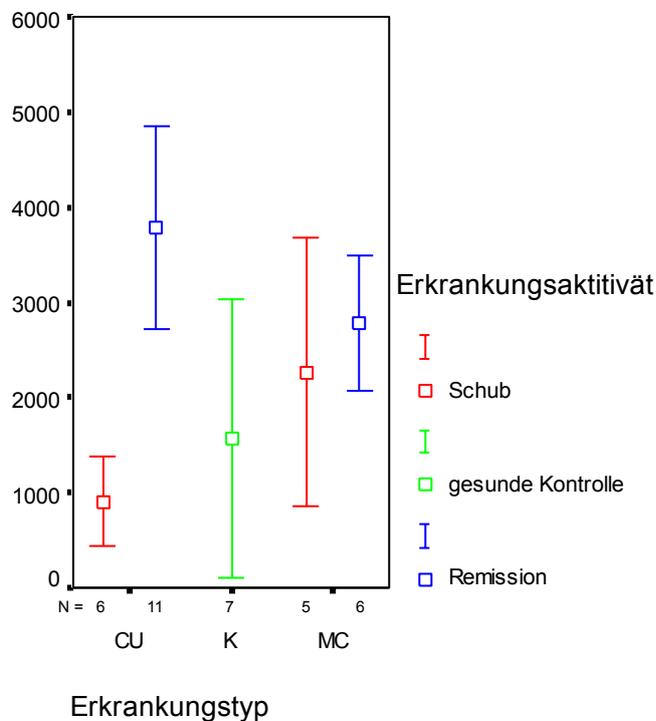


Abbildung 27: IL-6 (pg/ml) Produktion der MDC-1 nach 20 h Kultur mit LPS

Bei den Messungen des Zytokin IL-6 lag der Mittelwert der gesunden Kontrollen bei 1569,44 pg/ml \pm 736,0 (SE). Im Vergleich hierzu die IL-6 Produktion der MDC-1 CU Patienten in Remission bei 3780,0 pg/ml \pm 535,0 (SE) ($p < 0,05$) und die der MC Patienten bei 2774,0 pg/ml \pm 356,1 (SE) (nicht signifikant).

Auch bei diesen Ansätzen zeigte sich, dass bei MDC-1 von Patienten im akuten Schub eine verminderte Zytokinproduktion IL-6 im Vergleich zur Remission gemessen wurde, in der Population der CU Patienten sogar geringer als die gesunden Kontrollen.

4 Diskussion

Es gelang im Rahmen der Versuche humane DC, sowohl PDC als auch die Populationen der MDC-1 und MDC-2 aus peripherem Venenblut, anhand von FACS Messungen quantitativ darzustellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl bei MC als auch bei CU Patienten, die sich im akuten Entzündungsschub befinden, eine verminderte Anzahl an DC Zellen im peripheren Blut zu messen war. Die zusätzlichen Messungen der Oberflächenmarker lassen den Schluss zu, dass es sich bei den DC, die im Rahmen der Entzündungsreaktion dem peripheren Blut verloren gehen, um unreife DC handelt, die in entzündete Gewebe auswandern und bei diesem Vorgang reifen.

Beim Prozess der Migration spielt das so genannte Homing eine wesentliche Rolle. Mit Hilfe von Homing Faktoren können Zellen an Geweben adhären und in Gewebe einwandern. CD62L ein Adhäsionsmoleküle und Alpha4-beta7-Integrin, ein Marker der bei der Migration von Leukozyten in den extrazellulären Raum unter Entzündungsbedingungen eine wichtige Rolle spielt, wurden in diesem Zusammenhang an DC gemessen.

Bei CED Patienten konnten im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf PDC und MDC-1 Populationen eine vermehrte Ausbildung des homing-Markers Alpha4-beta7-Integrin nachgewiesen werden.

Um das Entzündungsgeschehen im Darm besser nachvollziehen zu können wurden DC Messungen an Mukosa-Präparaten durchgeführt. Es gelang, DC in der Population der CD45+ Zellen der Mukosa mittels FACS Färbungen nachzuweisen. Die Mukosa von Patienten mit CU und auch MC zeigte im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen einen signifikant höheren Anteil an PDC und MDC-1.

Es gelang zudem MDC-1 aus peripherem Venenblut in sehr hoher Reinheit zu isolieren und für Zytokinmessungen in Kultur zu nehmen. Es konnten signifikant erhöhte Produktionen der Zytokine TNFalpha und IL-6 bei Patienten in Remission im Vergleich zu gesunden Probanden in der Population der mit LPS stimulierten MDC-1 gemessen werden.

4.1 Quantitative Messungen an dendritischen Zellen aus peripheren Venenblut

Der Nachweis von DC Subpopulationen im peripheren Blut wurde nach Identifizierung spezifischer Antikörper (CD1c, BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4) für die einzelnen peripheren Blut Subpopulationen PDC, MDC-1 und MDC-2 (39) vereinfacht.

Periphere DC können mit diesen Antikörpern direkt in der Population der PBMC durchflusszytometrisch identifiziert und in die Subpopulationen PDC, MDC-1 und MDC-2 zugeordnet werden.

Das Problem in der Identifizierung der Populationen von PDC und MDC im peripheren Blut liegt im Fehlen typischer Reifemarker auf der Oberfläche der frisch isolierten DC. Aus diesem Grund waren in der Vergangenheit zur Identifizierung der DC entweder zeitaufwendige *in vitro* Kulturen notwendig, die erst durch Kultur der DC zur Ausbildung noch fehlenden Identifizierungsmarker führten, und so die Oberfläche und den Reifungsgrad der DC veränderten (88;89), oder es wurde durch aufwendige Anreicherungsverfahren versucht, DC mit Hilfe von diversen Antikörper-Kombinationen zu isolieren (36). Die Tatsache, dass DC im peripheren Blut lediglich einen Anteil zwischen 0,1 und 0,2 % ausmachen, erschwerte die genannten Verfahren zusätzlich.

Mit Hilfe der bereits erwähnten BDCA Antikörper gelang es, DC in ausreichender Menge und guter Reinheit aus dem peripheren Blut von kranken und gesunden Probanden direkt darzustellen.

Es wurden diesbezüglich quantitative Messungen an den peripheren Blut DC vorgenommen, wobei gezeigt werden konnte, dass CED Patienten im Schub eine verminderte Anzahl an allen drei peripheren DC Populationen (PDC, MDC-1 und MDC-2) aufweisen. Der Rückgang an peripheren DC war besonders stark in der Population der PDC festzustellen. DC vermindern also im Rahmen von akuten Entzündungsreaktionen im peripheren Blut ihre Anzahl. Es kann vermutet werden, dass die DC auf Grund ihrer Rolle im Immunsystem in Bereiche von Entzündungen auswandern, um dort das Entzündungsgeschehen mit zu bestimmen.

Es wurde außerdem festgestellt, dass sich die Ergebnisse der gemessenen DC der CED Patienten, die sich im Zustand der Remission befanden, nur unwesentlich von den Werten der gesunden Kontrollen unterschieden. Diese Tatsache weist darauf hin, dass die DC erst im Stadium der akuten Entzündung aus dem peripheren Blut auswandern. Im Rahmen von Entzündungsreaktionen stehen die DC vermehrt unter Einfluss bestimmter

chemotaktischer Reize und Stimuli, die in den entzündeten Regionen gebildet werden und so Einfluss auf die Migrationsvorgänge der DC nehmen.

Die Tatsache, dass die Ergebnisse einen DC Verlust in der Peripherie im Stadium der akuten Entzündung beschreiben führte zu allgemeinen Betrachtungen der DC Wanderungsvorgänge, nicht nur im Gebiet der Gastroenterologie. Als ein Beispiel hierfür ist der systemischen Lupus erythematoses (SLE) aufzuführen. Hier wurde eine Verringerung peripherer TNFalpha produzierender PDC im peripheren Blut von Patienten mit SLE fest gestellt (90) und gleichzeitig gezeigt, dass eine Anreicherung von PDC in den entzündeten Hautläsionen der SLE Patienten (91;92) stattfindet. Dies weist darauf hin, dass sich die DC im Rahmen akuter Entzündungen vermehrt in den entzündeten Gebieten ansammeln und so der Peripherie verloren gehen.

Auch im Rahmen von akuten Graft-Versus-Host Erkrankungen, rheumatoider Arthritis (RA) oder psoriatischer Arthritis wurden bereits verminderte Zellzahlen von peripheren DC festgestellt (93) (94).

Die Zellzahlen an DC in den verschiedenen Regionen unter Entzündungsbedingungen wurden gerade in Hinblick auf CED auch bereits durch andere Arbeitsgruppen betrachtet. Sie stellten ebenfalls Unterschiede in der Zellzahl von DC im peripheren Blut erkrankter Personen verglichen mit gesunden Probanden fest (95).

Es wurden geringe, jedoch nicht signifikante Unterschiede, bei den CD11- HLA-DR+Lin- (CD123bright) gemessen. Gar keine Unterschiede zeigten sich allerdings im Vergleich der Zellzahl zwischen Gesunden und Kranken bei den CD11+ HLA-DR+Lin- Zellen.

Bezüglich der abweichenden Ergebnisse kann festgestellt werden, dass zur Erhebung der genannten Werte eine andere Identifizierungsmethode für PDC und MDC benutzt wurde. Die Zellen wurden über Antikörper Cocktails (Lin- = CD3-, CD19-, CD14- und CD16-) identifiziert. Diese Methode erscheint, verglichen mit der Identifizierung über spezielle Antikörper für DC, wie sie in unserem Versuchsaufbau verwendeten wurden, als weniger DC spezifisch. Dies liegt daran, dass die DC Populationen in der anschließenden durchflusszytometrischen Messung nicht als doppelt positiv für zwei bestimmte Marker gesehen werden, sondern es wird angenommen, die Zellen wären HLA-DR positiv und Lin- negativ. Unter dieser Annahme werden die DC Population aus einer für die oben genannte Antikörper Cocktails negativen Zellpopulation identifiziert.

Durch die BDCA Antikörper allerdings können die DC als direkte Population gezeigt werden. Mit der Methode der HLA-DR und Lin- Färbung ist keine direkte Population

sichtbar und die Definition der Grenze, bei der die Zellen als HLA-DR positiv oder Lin-negativ gesehen werden ist nicht exakt definiert.

Zusätzlich wurden zur Einstufung der an CED erkrankten Patienten andere Indizes verwendet. Bei den gezeigten Ergebnissen verwendeten wir zur Klassifizierung der Patienten den MTWSI für CU Patienten und den HBI-Index für MC Patienten. Auch dies kann zu Abweichungen innerhalb der verschiedenen Versuchsergebnisse führen, da die berechneten Aktivitätsindizes die Patienten in Schub und Remissionsgruppen einteilen und so bei deren Vergleichen andere Ergebnisse entstehen können.

4.2 Oberflächenmarker Bestimmungen an periphere dendritischen Zellen

4.2.1 Messung kostimulatorischer Moleküle an dendritischen Zellen

DC existieren in unterschiedlichen Reifegraden im Organismus. Dies ist bedingt durch die Aufgaben, die die DC im Rahmen von Entzündungsreaktionen im Körper übernehmen.

Im Rahmen der Antigenpräsentation, einer der wichtigsten Aufgaben der DC, wird sie aktiviert und es kommt anschließend zur Ausreifung kostimulatorischer Moleküle auf ihrer Oberfläche (96). Diese sind wichtig im Kontakt der DC mit TC, da die Präsentation der geladenen Antigene erst durch kostimulatorische Moleküle ermöglicht wird.

Die Aktivierung der DC findet bedingt durch eine Vielzahl von Gefahrensignalen statt. Stimuli wie z.B. Bakterien, Viren oder Zytokine (TNFalpha, GM-CSF) die im Rahmen einer Entzündungsreaktion oder eines Zellzerfalls frei werden, führen so zu einer Entwicklung der DC zu einer hochpotenten APC.

Innerhalb des Reifungsprozesses der DC werden Endozytose- und auch Phagozytose-Rezeptoren herab reguliert. Auch Rezeptoren die für die Antigenaufnahme verantwortlich sind, wie zum Beispiel CD206, werden weniger exprimiert, befindet sich die DC erst einmal im Stadium der Aktivierung.

Dagegen werden MHC-II Moleküle, die wichtige Aufgaben in der Antigenpräsentation übernehmen und kostimulatorische Moleküle (CD80, CD83, CD86), die den Zellkontakt und die Antigenpräsentation erleichtern, vermehrt auf der DC Oberfläche ausgeprägt (37;97;98).

Im Rahmen der Versuche war es nun wichtig, die peripheren DC gerade bezüglich genannter Marker noch näher zu charakterisieren, um sehen zu können welche Unterschiede in der Funktion innerhalb der genannten Entzündungsvorgängen die DC der Patienten eventuell im Vergleich zu den DC der Gesunden aufweisen.

Es wurde zunächst HLA-DR gemessen, ein Rezeptor der MHC II Gruppe, der es den DC möglich macht, die aufgenommenen Antigene zu präsentieren. Dass HLA-DR auf der DC Oberfläche vorhanden ist und auch zu deren Identifizierung oft eingesetzt wird, ist bereits bekannt (31).

HLA-DR zeigte sich bei den Messungen auf der Oberfläche der PDC und MDC-1 Population. Die gemessenen DC der Patienten als auch der kranken Probanden waren HLA-DR positiv. Es konnten hier keine Unterschiede in der Expression dieses Markers zwischen den DC der Erkrankten und den DC der gesunden Probanden gefunden werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die gemessenen DC der Gesunden und Kranken im Vergleich keinen geänderten Phänotyp in Bezug auf HLA-DR besitzen. Eine Tendenz, die sich im Rahmen der Ergebnisse noch gezeigt hat, besteht in einer leicht verringerten Prozentzahl der HLA-DR Expression auf der Oberfläche der DC im akuten Schub. Da andere Arbeitsgruppen bereits heraus fanden, dass HLA-DR vermehrt auf gereiften PDC zu messen ist (99), indem sie zeigten, dass die absolute Anzahl der HLA-DR Moleküle auf der Zelloberfläche von DC nach 48 Stunden Kultur zunimmt, lässt sich der leichte Rückgang der HLA-DR Expression im Schub so erklären, dass die gereiften und aktivierten DC der Patienten bereits ausgewandert sind, also nur noch unreife, nicht in den Entzündungsvorgang involvierte DC, im peripheren Blut zu sehen sind.

Ikeda et al. konnten zeigen (100), dass vor allem auf der Oberfläche aktivierter und gereifter DC von CU Patienten HLA-DR vermehrt gemessen werden konnte.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die identifizierten peripheren DC von CED Patienten sowie von gesunden Probanden sich noch im unreifen Zustand befanden, da sie noch nicht vermehrt MHC Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. HLA-DR wird erst im Stadium einer akuten Entzündung, nach dem Antigen Kontakt und der damit verbundenen Reifung auf der Oberfläche der DC verstärkt gebildet.

Des Weiteren konnte der Oberflächenmarker CD86 auf der Oberfläche von PDC als auch MDC nachweisen. Man konnte hier jedoch keine Unterschiede in der Expression dieses Markers zwischen Gesunden und Kranken erkennen. Möglicherweise wird dieser Marker erst vermehrt durch Kontakt der Zellen mit Stimuli, auf dem Weg der Migration, ausgebildet, denn es wurde bereits durch andere Arbeitsgruppen gezeigt, dass gerade CD86 vermehrt auf der Oberfläche von DC exprimiert wird, die zuvor unter Einfluss von Stimulanzen in Kultur aktiviert wurden (95) und so die Möglichkeit zur vermehrten Reifung hatten.

Eine andere Arbeitsgruppen zeigte, dass bei CU-Patienten signifikante Unterschiede in der Expression von CD86 zu sehen war, stellte allerdings keine Veränderungen bei MC-Patienten im Vergleich mit gesunden Probanden fest (100).

Mit diesem abweichendem Ergebnis wird ein interessanter und viel diskutierter Punkt in der Forschung mit DC angesprochen, denn im Rahmen des Versuchsaufbaus dieser Arbeitsgruppe wurde eine Methode verwendet, die die DC bereits auf dem Weg ihrer Isolation verändert. DC werden bei dieser Methode aus Monozyten generiert. Dies geschieht, indem adhärenenten PBMC mittels GM-CSF und IL-4 kultiviert werden. Diese Methode der DC Identifizierung bringt die DC dazu, in einen aktivierten Zustand überzugehen. In diesem Reifungszustand exprimiert die DC auch vermehrt kostimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche.

Das erwähnte Problem bezüglich des Vergleiches von direkt isolierte DC und generierte DC beschäftigte bereits die Arbeitsgruppe um *Radford* (101). Sie verglichen in ihren Messungen die Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche von Monozyten generierten DC und frische isolierten DC und zeigten die Unterschiede auf. Es zeigte sich, dass DC im frisch isolierten Zustand wenig kostimulatorische Moleküle aufweisen. Im Unterschied zu aus Monozyten generierten DC haben sie jedoch die Fähigkeit, diese Moleküle unter Bedingungen der Kultur vermehrt auszuprägen (101).

Die beiden unterschiedlichen Methoden sind anerkannte und weit verbreitete Vorgehensweisen in der DC Forschung, sollten jedoch im Vergleich miteinander kritisch betrachtet werden.

Weitere kostimulatorische Moleküle wie z.B. CD83 und auch CD1a konnten in den Messungen nicht auf den peripheren DC nachgewiesen werden. Dies bestätigte auch die Gruppe um *Zhou* (43). Sie zeigten, dass DC spezifische Antigene wie CD83 auf peripheren Blut DC kaum vorhanden sind, sondern ebenfalls erst im aktivierten Zustand auf DC zu finden sind.

Die durchgeführten Messungen bezüglich der genannten Oberflächenmarker lassen den Schluss zu, dass es sich bei den peripheren gemessenen DC um noch unreife, nicht aktivierte DC handelt, da ihnen wichtige Aktivierungs- und Reifemarker noch fehlen.

In nachfolgenden Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden dass nach Zugabe von Aktivierungssubstanzen (zum Beispiel LPS) ein deutlich vermehrter Nachweis der genannten Aktivierungsmarker nachgewiesen werden konnte (Daten hier nicht gezeigt).

Ein anderer Diskussionspunkt bezüglich unserer Experimente und auch bezüglich eventuell abweichender Versuchsergebnisse zu anderen Arbeitsgruppen ist die Tatsache,

dass eine Vielzahl von Medikamenten Einfluss auf die DC und das Immunsystem nehmen. DC können in ihrer Reifung durch den Einfluss von Medikamenten behindert werden und könnten so einen anderen Phänotyp aufweisen. Es wurde bereits gezeigt, dass immunsuppressive Medikamente, wie z.B. Glucocorticoide mit DC interferieren und so evtl. ihren Phänotyp verändern könnten (102) (103). In den gezeigten Experimenten wurde darauf geachtet, dass Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine immunmodulatorischen Medikamente erhielten.

Auch eventuelle Effekte anderer, nicht immunmodulatorischer Arzneimittel auf die Funktion der DC wurden bereits beschrieben. Es zeigte sich beispielsweise ein inhibitorischer Effekt auf die Reifung der DC durch die Gabe von Aspirin (104). Die Ergebnisse dieser Untersuchung beruhen auf *in vitro* Experimenten an unreifen DC, die unter dem Einfluss von Aspirin in vermindertem Masse fähig waren TC zu stimulieren. Dies ist ein Aspekt den es weiterhin zu betrachten gilt. Es gibt jedoch noch keine definitiven Studien die belegen, in welcher Dosierung und in welchen zeitlichen Abständen von der Blutentnahme Aspirin Tabletten tatsächlich veränderte Versuchsergebnisse liefern.

Aus den genannten Gründen wurde jedoch trotzdem darauf geachtet, dass Patienten keine Vormedikation erhalten hatten, um eventuelle Effekte auf die DC Messungen ausschließen zu können.

4.2.2 DC bilden im Entzündungszustand vermehrt Migrationsmarker aus

Nach Aktivierung der DC im Rahmen von Entzündungsreaktionen wurden auf der DC Oberfläche auch zunehmend Chemokinrezeptoren und Migrationsmarker ausgebildet. Alpha4-beta7-Integrin, ein wichtiger Migrationsmarker, wurde auf DC, die in Lymphregionen wandern, bereits nachgewiesen (105;106).

Die Ergebnisse zeigen, dass die periphere PDC, MDC-1 und MDC-2 von Patienten im akuten CED Schub vermehrt den Homing-Marker CD49d ausbilden. Dies deutet darauf hin, dass DC unter Bedingungen akuter Infektion in lymphatische Regionen auswandern.

Diese Hypothese wird gestützt durch das Wissen, dass humanisierte (Antikörper) AK gegen den Alpha4-beta7-Integrin Rezeptoren bereits mit therapeutischem Ziel an CED Patienten getestet wurden und eine vermehrte Remission sowohl bei CU als auch bei MC

Patienten erreicht wurde (106;107). Die Blockierung des Migrationswegs mit Hilfe von AK scheint die Entzündungsbereiche besser heilen zu lassen. Es kann angenommen werden, dass die AK Therapie gerade auf die DC, insbesondere die MDC, einen großen Einfluss nimmt, da gezeigt werden konnte, dass gerade die MDC Populationen verstärkt den Alpha4-beta7-Integrin Marker auf ihrer Oberfläche exprimieren. MDC zeigten sich in den gezeigten Experimenten auch vermehrt (im Vergleich zu Gesunden) im Darm der Patienten vorhanden. Zudem zeigten gerade die CBA Messungen, dass durch Stimulation mit LPS MDC zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen angeregt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass gerade die MDC das Entzündungsgeschehen im Darm der CED Patienten stark beeinflusst.

CD62L ist bekannt als ein Adhäsionsmolekül der Gruppe der L-Selectine, welches vor allem für die Wanderung der Leukozyten (neutrophile Granulozyten) aus dem Blutssystem in das Gewebe verantwortlich ist um dort Antigene zu präsentieren (85;108).

In der Literatur wurde CD62L schon mehrfach auf zirkulierenden T-Zellen auf dem Weg vom Gefäßsystem in die Lymphorgane nachgewiesen, so dass es als aussagekräftiger Marker für die Migrationsfähigkeit von T-Zellen steht (109). CD62L wurde auch in der Vergangenheit bereits auf der DC Oberfläche von peripheren Blut DC nachgewiesen (41). Die DC wurden deshalb auf Vorhandensein diesen Marker untersucht. Es konnte CD62L bei einem Großteil der PDC nachgewiesen werden.

Bei den MDC war CD62L jedoch nicht so stark auf der Oberfläche ausgeprägt. Außerdem konnten bezüglich dieses Markers kaum Unterschiede in der Expression zwischen DC von CED Patienten und DC von gesunden Kontrollen gemessen werden. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen jedoch eine bestimmte Tendenz, denn Patienten im akuten Schub wiesen noch leicht verminderte Werte für CD62L positiven Zellen im Vergleich zu den Remissionen und Gesunden auf.

Auch auf dem Gebiet der rheumatoider Arthritis und Psoriasis arthropathica konnten bei Messungen an peripheren Blut DC keine vermehrte Expression von CD62L gezeigt werden (94).

Die Daten weisen darauf hin, dass der CD62L Rezeptor bei den peripheren zirkulierenden DC erst in einem späteren Stadium der Aktivierung und Migration auf der Oberfläche ausgebildet wird und die von uns gemessenen zirkulierenden DC der Patienten im akuten Schub dieses Aktivierungsstadium noch nicht erreicht hatten. Eine andere Hypothese wäre, dass die verbliebenen DC der Schub Patienten an den genannten Migrationsvorgängen nicht teilnehmen und aus diesem Grund CD62L geringer exprimieren.

4.2.3 Nachweis von DC Populationen in humaner Darmmukosa

Es gelang in den Versuchen Populationen von PDC und auch MDC-1 in CD45+ angereicherten Zellen der Lamina propria nachzuweisen. Die Ergebnisse zeigten eine erhöhte Anzahl von sowohl PDC als auch MDC-1 in der Darmmukosa der an CED erkrankten Patienten im Vergleich zu nicht an CED erkrankten Kontrollgruppen.

Die Versuchsergebnisse waren jedoch stets begrenzt durch die Verfügbarkeit von humanem Darmgewebe. Sie stellen somit einen Zwischenstand dar, der in Zukunft noch weiter untersucht werden sollte.

Es scheint, dass die DC der Patienten, die der Peripherie verloren gehen, sich in den Entzündungsherden des Darms ansammeln.

Ein weiterer erschwerender Faktor bei der Identifizierung der DC in der Mukosa liegt in der begrenzten Zellzahl. DC machen im peripheren Gewebe weniger als 1% der Zellen aus (110). Aufwendige Methoden der Isolierung sind nötig die DC direkt aus dem Gewebe darzustellen und minimieren zusätzlich die Anzahl der zum Versuchsaufbau benötigten Zellen.

Auf Grund der genannten Faktoren wird schon seit längerem vermehrt mit aus Tiermodellen isolierten DC gearbeitet. Der Vorteil hierbei liegt zum Grossteil in der nahezu unbegrenzten Materialverfügbarkeit. Auf diesem Gebiet konnte bereits mehrfach die Ansammlung von mononuklearen Zellen, insbesondere DC, in der Lamina propria von mit CED infizierten Mäusen nachwiesen werden (111-113).

In diesem Zusammenhang ist jedoch zu erwähnen, dass die Ergebnisse auf Grund der künstlich induzierten Erkrankungsstadien bei den Tiermodellen nicht identische Verhältnisse wieder spiegeln, wie sie zum Beispiel bei Experimenten mit humanem Material vorliegen.

Jedoch auch in Versuchen an humanem Gewebe wurde bereits mit Hilfe immunhistochemischer Methoden gezeigt, dass eine vermehrte DC Ansammlung im Darm von CED Patienten zu finden ist. Die hier gezeigten DC wiesen zudem vermehrt Aktivierungsmarker, wie z.B. CD80 oder CD83 auf ihrer Oberfläche auf (114) (100).

Auch CD40, ein wichtiger Marker für die Aktivierung und Reifung der DC, wird auf DC von CED Patienten, die im Darm akkumulieren, verstärkt ausgebildet (115).

TLR-2 und TLR-4 Rezeptoren, die eine wichtige Funktion in der Aktivierung von TC durch DC spielen, wurden ebenfalls vermehrt auf der Oberfläche der DC in der Mukosa der CED

Patienten nachgewiesen (115). Dies zeigt, dass die im Darm akkumulierten DC von CED Patienten verstärkt auf mikrobielle Stimuli reagieren könnten.

Die DC der Patienten scheinen somit nicht nur verstärkt im Darm der CED Patienten vorhanden, sondern durch bestimmte Voraussetzungen zusätzlich potenter in ihrer Möglichkeit, den Entzündungsprozess aufrecht zu erhalten.

Der hauptsächliche Diskussionspunkt bezüglich der eben erwähnten Ergebnisse liegt jedoch sicherlich darin, dass Versuche bezüglich des Nachweises der DC in der Darmmukosa vor allem auf Daten von Tiermodellen, und nicht auf Daten von humanem Gewebe beruhen. Die Ergebnisse spiegeln somit nicht die identischen Vorgänge wieder, wie sie im humanem Organismus und Darmgewebe zu finden sind und müssen deshalb kritisch betrachtet werden.

Es scheint jedoch klar, dass DC im Rahmen von CED Erkrankungen unter Bedingungen der akuten Entzündung in den Darm wandern und dort das Entzündungsgeschehen mitbestimmen.

Um die Wanderungsvorgänge der DC noch besser verstehen zu können, sind weitere Versuche und auch Methoden vor allem an humanem Gewebe nötig. Denkbar sind hier Experimente weiterer Markerbestimmungen an den in der Darmmukosa nachgewiesenen Zellen, die etwas über deren Aktivierungszustand aussagen. Zum anderen wäre noch verstärkt die direkte Darstellung der DC im Darm interessant, um die Lokalisation im Gewebe genauer zu definieren. Die Lokalisation könnte Aufschlüsse über den Angriffsweg der Entzündung auf das Gewebe geben.

4.3 Isolation der DC aus peripherem Venenblut

Ein Großteil von Forschungsvorhaben und Experimenten an DC basiert auf der Generierung von DC *in vitro* aus Monozyten oder Stammzell abgeleiteten Kulturen. Diese Methode ist umstritten, da Ergebnisse nicht direkt auf *in vivo* DC übertragbar sind.

Aus Monozyten Kultur abgeleitete DC verhalten sich nach Stimulation in Kultur betreffend ihrer Ausprägung kostimulatorischer Moleküle und Zytokinproduktion anders als direkt aus dem Blut isolierte DC (101).

In den genannten Experimenten wurde deshalb mit der Methode der direkten Isolation von PDC und MDC-1 Populationen aus peripherem humanem Venenblut mit Hilfe der MACS-Zellseparation gearbeitet.

Die Probleme bei dieser Methode der DC Isolation, die direkt aus dem peripheren Blut vorgenommen wird, liegen vorrangig in der begrenzten Zellzahl. DC machen im peripheren Blut lediglich einen Prozentsatz $<0,1\%$ der Blut Leukozyten aus (110).

Die unter Punkt 4.1 genannten Ergebnisse zeigen, dass DC bei Patienten im akuten Schub vermindert im peripheren Blut vorhanden sind. Gerade deshalb ist es schwierig, DC in ausreichender Menge für weiterführende Versuche bei Patienten im akuten Schub zu isolieren.

Trotz dieser Faktoren gelang es, MDC-1 in hoher Reinheit ($> 95\%$) zu isolieren, um weitere Versuche mit ihnen durchführen zu können.

4.4 Kultur mit isolierten dendritischen Zellen aus peripheren Venenblut

Die Messungen des Migrationsmarker und auch die Messungen zum Nachweis von DC in humaner Darmmukosa von CED Patienten zeigten, dass sich vor allem die Population der MDC in den erhobenen Daten als entscheidend im Migrationsvorgang zeigen. Hier wurde vermehrt der Homing-Marker CD49d auf der Oberfläche der MDC-1 nachgewiesen, zudem gelang es vor allem in der Population der MDC-1 ausreichend hohe Reinheitsraten (>95%) zu erlangen so dass die genannten Ergebnisse und das zusätzlich bereits erwähnte Problem der Material Beschaffung (geringe DC Zellzahlen im humanem peripheren Blut) welches zur Isolation der DC nötig ist, zu der Entscheidung führten, Messungen der Zytokine nach DC Kultur vorerst nur an isolierten MDC-1 vorzunehmen. Erste Versuche mit PDC werden aktuell bereits durchgeführt.

DC benötigen zur Induktion einer potenten Immunantwort einen Stimulus, der sie befähigt, Zytokine auszuschütten und so eine Entzündungsreaktion anzuschleppen (34).

Die isolierten MDC wurden mit LPS stimuliert. LPS hat die Fähigkeit, MDC reifen zu lassen und sie zu aktivieren, indem sie CD80, CD83 und auch CD86 hochregulieren (116). Durch Stimulation mit LPS steigt außerdem die Zytokinproduktion bei den MDC (z.B. IL12p70) (117).

In Versuchen, in denen die MDC mit CpG-DNA Sequenzen stimuliert wurden, konnte keine Aktivierung bzw. Zytokinproduktion in den Kulturen der MDC festgestellt werden.

Es ist bekannt, dass in Mäusen TLR-9 Rezeptoren, die die Stimulation mit CpG-DNA auf der Zelloberfläche vermitteln, sowohl auf PDC als auch auf MDC exprimiert werden (118;119). Dagegen konnten Untersuchungen bezüglich des Vorkommens von TLR-9 auf humanen DC diesen bis jetzt nur auf der Population der PDC nachweisen (120).

Es ist jedoch auch bekannt, dass DC nicht nur über die TLR-Rezeptoren, also direkt durch die Pathogene, beeinflusst werden. Es existieren verschiedene alternative Wege, geregelt über Chemokine, Zytokine und Komponenten der extrazellulären Matrix, die ebenso zu einer Stimulation der DC führen können (121).

Dass zur Stimulation der MDC verwendete LPS kann unterschiedliche Immunantworten herbeiführen, abhängig aus welchem pathogenem Stamm die Isolation durchgeführt wurde (122). In den gezeigten Experimenten wurde LPS verwendet, welches zuvor aus E.coli Stämmen isoliert wurde. Hier ist bekannt, dass dies über den TLR-4 Rezeptor wirkt.

TLR-4 ist auf der Oberfläche von humanen MDC bereits beschrieben worden und wird vor allem für eine Th1-Antwort *in vitro* durch LPS induziert verantwortlich gemacht (123).

Ein Problem in Kulturen mit DC wurde bereits in der Vergangenheit durch andere Arbeitsgruppen angesprochen. Es handelt sich um die mögliche Kontamination der DC Kulturen durch andere Zellsorten. Da die DC zwar mit sehr guter Reinheit isoliert werden konnten (> 95%), stellt sich jedoch die Frage, in wieweit die restlichen Prozent nicht DC Einfluss auf die Kulturen und gemessenen Zytokine nehmen könnten.

Die Gruppe um *Shortman* (124) zeigte beispielsweise eine Kontamination durch Monozyten (~3%) in Kulturen von PDC.

Da die Isolation der MDC eine Depletierung der CD19 positiven Zellen bereits beinhaltet und nach der Isolation, im so genannten Reinheitscheck am FACS, die MDC auf Vorhandensein von CD14 geprüft werden und hier auch negativ waren, konnte das Risiko der Kontamination zumindest durch Monozyten und B-Zellen gering gehalten werden.

4.5 Isolierte MDC produzieren in Kultur mit LPS vermehrt TNFalpha und IL-6

Es ist bekannt, dass die bei einer Entzündung durch aktivierte TC pro-inflammatorische Zytokine ausgeschüttet werden, die dann wiederum Makrophagen zur Ausschüttung anderer pro-inflammatorischer Zytokinen anregen. Dieser Aktivierungsprozess wird zusätzlich durch verschiedene Faktoren zu einer Art Aktivierungskaskade ausgebaut. Zu diesen Faktoren zählen unter anderem Gewebefaktoren die freigesetzt werden, Chemokine und Proteasen (60;125).

Die Gruppe der pro-inflammatorische Zytokine spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der CED Erkrankungen, da sie das Entzündungsgeschehen im Darm unterstützen. Sie wurden in diesem Zusammenhang schon öfters beschrieben, auch weil sie zunehmend in der Therapie von CED Erkrankungen im Rahmen von Antikörper neutralisierenden Studien eingesetzt werden (126).

Es existiert die Hypothese dass DC im Rahmen der Pathogenese von CED auf mikrobielle Stimulatoren mit veränderter, überschießender Immunantwort durch Ausschüttung von Zytokinen typisch für eine Th1 oder Th17 getriggerte Immunantwort reagieren (127-129). Typische Zytokine dieses Entzündungsprozesses sind TNFalpha und IL-6. Sie wurden in den gezeigten Experimenten in Kulturen der MDC-1 mit und ohne mikrobielle Stimulatoren (LPS) gemessen.

TNFalpha ist ein wichtiger Faktor für die Reifung von DC. Dies wurde unter anderem gezeigt durch die Gruppe um Ye (130). Sie stellten fest, dass in Abwesenheit von TNFalpha die Generierung und Reifung von DC aus Makrophagen nicht in dem Maße stattfindet, wie es in Anwesenheit von TNFalpha der Fall ist.

DC können jedoch beides, zum einen auf Zytokine reagieren, zum anderen diese selber produzieren. Diese Fähigkeit ist jedoch abhängig davon, in welchem Stadium der Aktivierung sich die DC befindet.

Es wurde festgestellt, dass vor allem die noch unreifen DC verstärkt auf LPS reagieren und im Gegensatz zu reifen DC vermehrt TNFalpha produzieren (131). Auch wir stuften in unseren Versuchen die aus dem peripheren Blut isolierten DC von CED Patienten als unreif ein, da sie durch Fehlen bezüglich der Aktivierungsmarker noch in einem so genannten anergen/unreifen Zustand sind, indem sie TC noch nicht ausreichend stimulieren können. Diesen gereiften Zustand erreichen sie erst nach Migration unter Einfluss verschiedenster Stimuli. Zu dieser Migration kann TNFalpha direkt beitragen. In Studien an Haut DC wurde dies bereits gezeigt (132).

Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass MDC nach Stimulation mit LPS eine starke TNFalpha Produktion aufweisen (133), betrachteten jedoch in diesem Zusammenhang noch nicht, ob eventuell Unterschiede in der Funktion der MDC innerhalb bestimmter Erkrankungsbilder vorliegen.

IL-6 spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der TC Polarisierung. Zum einen induziert es vermehrt eine Th2 Differenzierung der TC und inhibiert gleichzeitig eine Th1 Differenzierung (134), andererseits wurde IL-6 in einer neueren Studie neben TGF-beta als für die Induktion einer über Th17-TC vermittelten Immunantwort verantwortlich gemacht (26). Somit nimmt IL-6 eine entscheidende Rolle in der TC Polarisierung und auch in der Pathogenese der CED Erkrankungen ein.

Es zeigte sich in unseren Experimenten, dass MDC von Patienten mit CED Erkrankungen in deutlich erhöhtem Masse pro-inflammatorische Zytokine IL-6 und TNFalpha produzieren als MDC von gesunden Probanden. Dies allerdings erst nach Stimulation der Kulturen mit LPS. Die Zytokinproduktion der Patienten in Remission zeigte sich im Vergleich zu den gesunden Kontrollgruppen signifikant erhöht. Überraschenderweise konnte sowohl bei TNFalpha als auch bei IL-6 gesehen werden dass Patienten im akuten Schub hier deutlich weniger Produktion pro-inflammatorischer Zytokine aufwiesen. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte eine Art Verbrauchszustand der MDC-1 sein, die im Rahmen der akuten Entzündung bereits viel pro-inflammatorische Zytokine ausschütten und dann auf genannte LPS Stimulation der Versuche keine weitere Zytokinproduktion mehr zusetzen können. Weitere Untersuchungen hierzu werden jedoch folgen.

MDC von Patienten reagieren also anders als MDC von gesunden Probanden auf die Begegnung mit pathogenen Substanzen. Sie produzieren nach Stimulation mit LPS vermehrt pro-inflammatorische Zytokine. Es scheint, dass ihre tolerogene Eigenschaft gegenüber pathogenen Substanzen, die auch in der normalen Darmflora als resident anzusehen sind, gestört ist. Die Ergebnisse zeigen jedoch vor allem, dass die DC der Peripherie bereits eine veränderte Reaktion gegenüber einer Stimulation durch LPS aufweisen. Dies macht deutlich, dass bereits die peripheren DC, die noch keinen Kontakt mit der Darmflora hatten, auf Stimuli durch verstärkte Zytokinproduktion reagieren, und somit bereits verändert sind.

Die vermehrten IL-6 Produktionen, die durch die MDC der Patienten gemessen wurde, zeigt, welch starken Einfluss die DC auf das Zytokin-Milieu haben und somit auch eine TC Polarisierung des Organismus verschieben können.

Die starke TNFalpha Produktion der Zellen trägt zusätzlich dazu bei, dass sich die DC in der Darm Mukosa der Patienten wiederum verstärkt ansammeln, da die Migrationsvorgänge durch hohe TNFalpha Spiegel unterstützt werden (132).

Auch in der Mukosa scheinen DC vermehrt pro-Inflammatorische Zytokine vor Ort zu produzieren, dies konnte bereits gezeigt werden. Vor allem die auch von uns gemessenen Zytokine TNFalpha und IL-6 waren signifikant erhöht in der Gruppe der CED Patienten (135).

Wie wichtig TNFalpha in der Pathogenese von CED Erkrankungen ist, unterstreicht noch einmal eine jüngste Studie. Es wurde gezeigt, dass die beiden wichtigsten TNFalpha Rezeptoren im Serum von CED Patienten (Remission sowie Schub) stark erhöht sind und sogar mit dem Aktivitätsindex der Erkrankungen korrelieren (136). Zudem wurde herausgefunden, dass hohe Konzentrationen an TNFalpha eine erhöhte Durchlässigkeit der tight junctions mit sich bringen und so die Darm Dysregulationen bei CED Patienten mit verursachen (137).

Die gefundenen Ergebnisse bezüglich des Zytokins TNFalpha machen zudem klar, warum Anti-TNFalpha bereits erfolgreich bei CU und MC Patienten im Rahmen der AK-Therapie eingesetzt wird (138).

Auf dem Gebiet der Forschung an rheumatoider Arthritis konnten bereits ähnliche Ergebnisse gezeigt werden. Aus Monozyten generierte MDC von Patienten mit RA produzierten unter Stimulation mit LPS vermehrt IL-6 und TNFalpha (139).

Auch in der Erforschung des systemischen Lupus erythematoses (SLE) spielen DC eine wichtige Rolle. Im peripheren Blut von SLE Patienten wurden vermindert DC Populationen gemessen, wohingegen die Serum Konzentration der Zytokine IL-6 und TNFalpha hier höher war als bei den gesunden Probanden (140).

Wie oben bereits beschrieben verläuft die Erkennung mikrobieller Stimuli wie LPS über TLR Rezeptoren, vor allem TLR-4 und TLR-2. Diese wurden bereits in Versuchen vermehrt auf MDC von CED Patienten nachgewiesen (141). Diese Ergebnisse untermauern die von uns gezeigten erhöhten Zytokinproduktionen Messungen an MDC-1 nochmals. Eigene Versuche zu Messungen an diesen Rezeptoren auf den MDC Populationen sind aktuell in Arbeit. Zudem werden Versuche zur Quantifizierung von LPS in den MDC vorgenommen um die Aufnahme dieser Stimulanz in die Zellen und die damit verbundene Immunreaktion weiter nachvollziehen zu können.

4.6 Ausblick

Die Ergebnisse machen deutlich, wie wichtig die Rolle der DC im Geschehen von CED Erkrankungen ist. Sie zeigen, dass DC im Rahmen der akuten Entzündung das Gefäßsystem verlassen und an den Ort der Entzündung migrieren können, um dort durch ihre veränderte Reaktion auf verschiedenen Stimuli das Entzündungsgeschehen zu beeinflussen und zu stören. Hieraus wird ersichtlich, dass gerade die Forschung auf dem Gebiet des humanen Gewebes uns helfen würde, die Vorgänge noch besser zu verstehen.

Die Möglichkeit der Isolation der DC in größerer Menge aus kleinstem Gewebe, wie sie zum Beispiel Biopsien darstellen, würde eine Vereinfachung bezüglich der Materialbeschaffung darstellen, die letztendlich in all unseren Versuchen den begrenzenden Faktor darstellte. Um DC noch näher betrachten zu können sind aber auch die Ausweitung der Messungen auf noch anderer Migrationsmarker sinnvoll, wie zum Beispiel CCR 7 oder CD40. Sie könnten über das „wie“ des Migrationsvorganges noch weiter Auskunft geben. Eine andere Möglichkeit der näheren Betrachtung dieser Vorgänge wurde durch die Gruppe um *Baumjohann* (142) jüngst beschrieben. Sie zeigten völlig neue Methoden auf, die es nicht-invasiv ermöglichen sollen, DC Wanderungen vor allem am lebenden Menschen näher zu betrachten. Zu diesen Methoden zählen zum Beispiel die Magnet Resonanz Tomographie (MRI) oder Positronen Emission Tomographie (PET), die auf anderen Gebieten im klinischen Alltag bereits tagtäglich eingesetzt werden.

Der DC-TC Kontakt als eine zentrale Rolle jeder Antigenpräsentation könnte in diesem Zusammenhang ebenfalls genauer betrachtet werden. Eine Methode wäre, diesen DC-TC Kontakt *ex vivo* direkt nachzustellen, also die direkte Kokultur (auch gemischte Lymphozyten Reaktion genannt = MLR) zwischen DC und TC.

In jedem Fall ist zu sagen, dass die zusammengefassten Ergebnisse sicherlich nur einen Bruchteil der Rolle von DC in CED Erkrankungen darstellen. Weiterführende Experimente auf diesem Gebiet, vor allem an humanem Gewebe können zukünftig vermehrte Einblicke in die komplizierten Vorgänge bei CED Erkrankungen geben und zum erfolgreichen Kampf gegen diese Krankheit beitragen.

Literaturliste

- (1) Steinhardt HJ, Loeschke K, Kasper H *et al.* European Cooperative Crohn's Disease Study (ECCDS): clinical features and natural history. *Digestion* 1985;**31**(2-3):97-108.
- (2) Farmer RG, Hawk WA, Turnbull RB, Jr. Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. *Gastroenterology* 1975;**68**(4 Pt 1):627-35.
- (3) Binder V. Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;**18**(3):463-79.
- (4) Rao SS, Holdsworth CD, Read NW. Symptoms and stool patterns in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1988;**29**(3):342-5.
- (5) Meucci G, Vecchi M, Astegiano M *et al.* The natural history of ulcerative proctitis: a multicenter, retrospective study. Gruppo di Studio per le Malattie Infiammatorie Intestinali (GSMII). *Am J Gastroenterol* 2000;**95**(2):469-73.
- (6) Ekbohm A, Helmick C, Zack M *et al.* Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* 1990;**336**(8711):357-9.
- (7) Heuschen UA, Hinz U, Allemeyer EH *et al.* Backwash ileitis is strongly associated with colorectal carcinoma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2001;**120**(4):841-7.
- (8) WILHELM FABRY (1560-1624)--THE OTHER FABRICIUS. *JAMA* 1964;**190**:933.
- (9) Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. *Mt Sinai J Med* 2000;**67**(3):263-8.
- (10) Kirsner JB. Historical aspects of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 1988;**10**(3):286-97.
- (11) Kirsner JB. Historical origins of medical and surgical therapy of inflammatory bowel disease. *Lancet* 1998;**352**(9136):1303-5.
- (12) Orholm M, Munkholm P, Langholz E *et al.* Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991;**324**(2):84-8.
- (13) Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE *et al.* Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 1996;**312**(7023):95-6.
- (14) Halfvarson J, Bodin L, Tysk C *et al.* Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 2003;**124**(7):1767-73.
- (15) Hugot JP, Zouali H, Lesage S *et al.* Etiology of the inflammatory bowel diseases. *Int J Colorectal Dis* 1999;**14**(1):2-9.

- (16) Kurata JH, Kantor-Fish S, Frankl H *et al.* Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology* 1992;**102**(6):1940-8.
- (17) Birrenbach T, Bocker U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis* 2004;**10**(6):848-59.
- (18) Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;**347**(6):417-29.
- (19) Blumberg RS, Strober W. Prospects for research in inflammatory bowel disease. *JAMA* 2001;**285**(5):643-7.
- (20) Makala LH, Nishikawa Y, Suzuki N *et al.* Immunology. Antigen-presenting cells in the gut. *J Biomed Sci* 2004;**11**(2):130-41.
- (21) Baumgart DC, Dignass AU. Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;**5**(6):685-94.
- (22) Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003;**3**(4):331-41.
- (23) Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2002;**2**(12):933-44.
- (24) Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;**17**(3):138-46.
- (25) Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;**6**(11):1123-32.
- (26) Bettelli E, Carrier Y, Gao W *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;**441**(7090):235-8.
- (27) Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006;**441**(7090):231-4.
- (28) Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003;**171**(12):6323-7.
- (29) Allez M, Mayer L. Regulatory T cells: peace keepers in the gut. *Inflamm Bowel Dis* 2004;**10**(5):666-76.
- (30) Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973;**137**(5):1142-62.
- (31) Romani N, Gruner S, Brang D *et al.* Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994;**180**(1):83-93.
- (32) Bell SJ, Rigby R, English N *et al.* Migration and maturation of human colonic dendritic cells. *J Immunol* 2001;**166**(8):4958-67.

- (33) Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 2001;**106**(3):259-62.
- (34) Banchereau J, Briere F, Caux C *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;**18**:767-811.
- (35) Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;**9**:271-96.
- (36) Freudenthal PS, Steinman RM. The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;**87**(19):7698-702.
- (37) Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;**392**(6673):245-52.
- (38) Stagg AJ, Hart AL, Knight SC *et al.* The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut* 2003;**52**(10):1522-9.
- (39) Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P *et al.* BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000;**165**(11):6037-46.
- (40) MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ *et al.* Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 2002;**100**(13):4512-20.
- (41) Robinson SP, Patterson S, English N *et al.* Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999;**29**(9):2769-78.
- (42) Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S *et al.* A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* 1998;**9**(3):325-36.
- (43) Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 1995;**154**(8):3821-35.
- (44) Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997;**90**(9):3245-87.
- (45) Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* 1999;**190**(2):229-39.
- (46) Maric I, Holt PG, Perdue MH *et al.* Class II MHC antigen (Ia)-bearing dendritic cells in the epithelium of the rat intestine. *J Immunol* 1996;**156**(4):1408-14.
- (47) Karlsson M, Lundin S, Dahlgren U *et al.* "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol* 2001;**31**(10):2892-900.
- (48) Rescigno M, Urbano M, Valzasina B *et al.* Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001;**2**(4):361-7.
- (49) van Niel G, Raposo G, Candalh C *et al.* Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 2001;**121**(2):337-49.

- (50) Guernonprez P, Valladeau J, Zitvogel L *et al.* Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002;**20**:621-67.
- (51) Mowat AM, Millington OR, Chirido FG. Anatomical and cellular basis of immunity and tolerance in the intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;**39 Suppl 3**:S723-S724.
- (52) Cella M, Engering A, Pinet V *et al.* Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997;**388**(6644):782-7.
- (53) Inaba K, Turley S, Iyoda T *et al.* The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* 2000;**191**(6):927-36.
- (54) Germain RN, Jenkins MK. In vivo antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2004;**16**(1):120-5.
- (55) Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**(1):351-8.
- (56) Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G *et al.* Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000;**192**(9):1213-22.
- (57) Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;**20**:197-216.
- (58) Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001;**106**(3):255-8.
- (59) Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;**5**(10):987-95.
- (60) Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001;**2**(8):675-80.
- (61) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;**408**(6813):740-5.
- (62) Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T *et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999;**11**(4):443-51.
- (63) Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001;**1**(2):135-45.
- (64) Milling SW, Cousins L, MacPherson GG. How do DCs interact with intestinal antigens? *Trends Immunol* 2005;**26**(7):349-52.
- (65) Duchmann R, Kaiser I, Hermann E *et al.* Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995;**102**(3):448-55.

- (66) Nakajima A, Kodama T, Yazaki Y *et al.* Specific clonal T cell accumulation in intestinal lesions of Crohn's disease. *J Immunol* 1996;**157**(12):5683-8.
- (67) Soderholm JD, Peterson KH, Olaison G *et al.* Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology* 1999;**117**(1):65-72.
- (68) Uhlig HH, Powrie F. Dendritic cells and the intestinal bacterial flora: a role for localized mucosal immune responses. *J Clin Invest* 2003;**112**(5):648-51.
- (69) Franchimont D, Vermeire S, El Housni H *et al.* Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004;**53**(7):987-92.
- (70) Hart AL, Al Hassi HO, Rigby RJ *et al.* Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2005;**129**(1):50-65.
- (71) Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;**411**(6837):599-603.
- (72) Barton GM, Medzhitov R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2002;**14**(3):380-3.
- (73) Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M *et al.* Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996;**157**(3):1261-70.
- (74) Toms C, Powrie F. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Microbes Infect* 2001;**3**(11):929-35.
- (75) Shanahan F, Duerr RH, Rotter JI *et al.* Neutrophil autoantibodies in ulcerative colitis: familial aggregation and genetic heterogeneity. *Gastroenterology* 1992;**103**(2):456-61.
- (76) Podolsky DK. The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;**16**(6):933-43.
- (77) Malmstrom V, Shipton D, Singh B *et al.* CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice. *J Immunol* 2001;**166**(11):6972-81.
- (78) Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR *et al.* Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002;**359**(9317):1541-9.
- (79) Maul J, Loddenkemper C, Mundt P *et al.* Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005;**128**(7):1868-78.
- (80) Kanai T, Watanabe M. Clinical application of human CD4+ CD25+ regulatory T cells for the treatment of inflammatory bowel diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2005;**5**(4):451-62.

- (81) Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet* 1980;**1**(8167):514.
- (82) TRUELOVE SC, WITTS LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955;**2**(4947):1041-8.
- (83) Ferrante A, Thong YH. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method. *J Immunol Methods* 1980;**36**(2):109-17.
- (84) Bull DM, Bookman MA. Isolation and functional characterization of human intestinal mucosal lymphoid cells. *J Clin Invest* 1977;**59**(5):966-74.
- (85) Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;**76**(2):301-14.
- (86) Sperandio M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J* 2006;**273**(19):4377-89.
- (87) Ito T, Amakawa R, Kaisho T *et al*. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 2002;**195**(11):1507-12.
- (88) Upham JW, Lundahl J, Liang H *et al*. Simplified quantitation of myeloid dendritic cells in peripheral blood using flow cytometry. *Cytometry* 2000;**40**(1):50-9.
- (89) McCarthy DA, Macey MG, Bedford PA *et al*. Adhesion molecules are upregulated on dendritic cells isolated from human blood. *Immunology* 1997;**92**(2):244-51.
- (90) Cederblad B, Blomberg S, Vallin H *et al*. Patients with systemic lupus erythematosus have reduced numbers of circulating natural interferon-alpha-producing cells. *J Autoimmun* 1998;**11**(5):465-70.
- (91) Blomberg S, Eloranta ML, Cederblad B *et al*. Presence of cutaneous interferon-alpha producing cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001;**10**(7):484-90.
- (92) Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F *et al*. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol* 2001;**159**(1):237-43.
- (93) Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA *et al*. Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* 1999;**93**(2):728-36.
- (94) Jongbloed SL, Lebre MC, Fraser AR *et al*. Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;**8**(1):R15.
- (95) Vuckovic S, Florin TH, Khalil D *et al*. CD40 and CD86 upregulation with divergent CMRF44 expression on blood dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 2001;**96**(10):2946-56.

- (96) Sallusto F, Cella M, Danieli C *et al.* Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;**182**(2):389-400.
- (97) Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**(6):2588-92.
- (98) Kim HJ, Yang JS, Woo SS *et al.* Lipoteichoic acid and muramyl dipeptide synergistically induce maturation of human dendritic cells and concurrent expression of proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol* 2007.
- (99) Drenou B, Amiot L, Setterblad N *et al.* MHC class II signaling function is regulated during maturation of plasmacytoid dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2005;**77**(4):560-7.
- (100) Ikeda Y, Akbar F, Matsui H *et al.* Characterization of antigen-presenting dendritic cells in the peripheral blood and colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;**13**(7):841-50.
- (101) Radford KJ, Turtle CJ, Kassianos AJ *et al.* CD11c+ blood dendritic cells induce antigen-specific cytotoxic T lymphocytes with similar efficiency compared to monocyte-derived dendritic cells despite higher levels of MHC class I expression. *J Immunother* 2006;**29**(6):596-605.
- (102) Lagaraine C, Lebranchu Y. Effects of immunosuppressive drugs on dendritic cells and tolerance induction. *Transplantation* 2003;**75**(9 Suppl):37S-42S.
- (103) Abe M, Thomson AW. Influence of immunosuppressive drugs on dendritic cells. *Transpl Immunol* 2003;**11**(3-4):357-65.
- (104) Matasic R, Dietz AB, Vuk-Pavlovic S. Cyclooxygenase-independent inhibition of dendritic cell maturation by aspirin. *Immunology* 2000;**101**(1):53-60.
- (105) Puig-Kroger A, Sanz-Rodriguez F, Longo N *et al.* Maturation-dependent expression and function of the CD49d integrin on monocyte-derived human dendritic cells. *J Immunol* 2000;**165**(8):4338-45.
- (106) Feagan BG, Greenberg GR, Wild G *et al.* Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. *N Engl J Med* 2005;**352**(24):2499-507.
- (107) Ghosh S, Goldin E, Gordon FH *et al.* Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003;**348**(1):24-32.
- (108) Martin P, Ruiz SR, del Hoyo GM *et al.* Dramatic increase in lymph node dendritic cell number during infection by the mouse mammary tumor virus occurs by a CD62L-dependent blood-borne DC recruitment. *Blood* 2002;**99**(4):1282-8.
- (109) Klinger A, Gebert A, Bieber K *et al.* Cyclical expression of L-selectin (CD62L) by recirculating T cells. *Int Immunol* 2009.
- (110) Van Voorhis WC, Hair LS, Steinman RM *et al.* Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *J Exp Med* 1982;**155**(4):1172-87.

- (111) Drakes ML, Blanchard TG, Czinn SJ. Colon lamina propria dendritic cells induce a proinflammatory cytokine response in lamina propria T cells in the SCID mouse model of colitis. *J Leukoc Biol* 2005;**78**(6):1291-300.
- (112) Karlis J, Penttila I, Tran TB *et al.* Characterization of colonic and mesenteric lymph node dendritic cell subpopulations in a murine adoptive transfer model of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;**10**(6):834-47.
- (113) Leithauser F, Trobonjaca Z, Moller P *et al.* Clustering of colonic lamina propria CD4(+) T cells to subepithelial dendritic cell aggregates precedes the development of colitis in a murine adoptive transfer model. *Lab Invest* 2001;**81**(10):1339-49.
- (114) te Velde AA, van Kooyk Y, Braat H *et al.* Increased expression of DC-SIGN+IL-12+IL-18+ and CD83+IL-12-IL-18- dendritic cell populations in the colonic mucosa of patients with Crohn's disease. *Eur J Immunol* 2003;**33**(1):143-51.
- (115) Hart AL, Al Hassi HO, Rigby RJ *et al.* Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2005;**129**(1):50-65.
- (116) Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M *et al.* Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001;**31**(11):3388-93.
- (117) Jotwani R, Pulendran B, Agrawal S *et al.* Human dendritic cells respond to Porphyromonas gingivalis LPS by promoting a Th2 effector response in vitro. *Eur J Immunol* 2003;**33**(11):2980-6.
- (118) Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M *et al.* Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med* 2003;**197**(1):101-9.
- (119) Edwards AD, Diebold SS, Slack EM *et al.* Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur J Immunol* 2003;**33**(4):827-33.
- (120) Kadowaki N, Ho S, Antonenko S *et al.* Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001;**194**(6):863-9.
- (121) Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003;**3**(12):984-93.
- (122) Pulendran B, Kumar P, Cutler CW *et al.* Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol* 2001;**167**(9):5067-76.
- (123) Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A *et al.* Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 2000;**1**(4):311-6.
- (124) Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002;**2**(3):151-61.

- (125) Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;**17**(3):138-46.
- (126) Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;**3**(7):390-407.
- (127) Uhlig HH, Powrie F. Dendritic cells and the intestinal bacterial flora: a role for localized mucosal immune responses. *J Clin Invest* 2003;**112**(5):648-51.
- (128) Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002;**20**:495-549.
- (129) Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007;**13**(2):139-45.
- (130) Ye Z, Chen Z, Sami A *et al*. Human dendritic cells engineered to express alpha tumor necrosis factor maintain cellular maturation and T-cell stimulation capacity. *Cancer Biother Radiopharm* 2006;**21**(6):613-22.
- (131) Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH *et al*. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2001;**166**(1):249-55.
- (132) Winzler C, Rovere P, Zimmermann VS *et al*. Checkpoints and functional stages in DC maturation. *Adv Exp Med Biol* 1997;**417**:59-64.
- (133) Ida JA, Shrestha N, Desai S *et al*. A whole blood assay to assess peripheral blood dendritic cell function in response to Toll-like receptor stimulation. *J Immunol Methods* 2006;**310**(1-2):86-99.
- (134) Diehl S, Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 2002;**39**(9):531-6.
- (135) McCormack G, Moriarty D, O'Donoghue DP *et al*. Tissue cytokine and chemokine expression in inflammatory bowel disease. *Inflamm Res* 2001;**50**(10):491-5.
- (136) Spoettl T, Hausmann M, Klebl F *et al*. Serum soluble TNF receptor I and II levels correlate with disease activity in IBD patients. *Inflamm Bowel Dis* 2007.
- (137) Weber CR, Turner JR. Inflammatory bowel disease: is it really just another break in the wall? *Gut* 2007;**56**(1):6-8.
- (138) Baumgart DC, Wiedenmann B, Dignass AU. [Biologic therapy of inflammatory bowel disease]. *Z Gastroenterol* 2003;**41**(10):1017-32.
- (139) Radstake TR, van Lent PL, Pesman GJ *et al*. High production of proinflammatory and Th1 cytokines by dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis, and down regulation upon FcγR triggering. *Ann Rheum Dis* 2004;**63**(6):696-702.
- (140) Robak E, Smolewski P, Wozniacka A *et al*. Relationship between peripheral blood dendritic cells and cytokines involved in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Eur Cytokine Netw* 2004;**15**(3):222-30.

- (141) Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ *et al.* Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2005;**129**(1):50-65.
- (142) Baumjohann D, Lutz MB. Non-invasive imaging of dendritic cell migration in vivo. *Immunobiology* 2006;**211**(6-8):587-97.

Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater PD Dr. med. Daniel C. Baumgart ganz herzlich für die Überlassung des Themas und seine sehr gute persönliche Betreuung meiner Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern im Labor der Forschungsgruppe CED bedanken. Insbesondere Diana Metzke, meiner inoffiziellen „Dr. Mami“, die über die Zeit zu einer sehr guten Freundin geworden ist. Des Weiteren Ingo Preszding, der mir mit Rat und Tat, vor allem in Computerdingen, zur Seite stand, sowie Saskia Thomas, die durch ihre immer hilfsbereite und freundliche Art mir so viel geholfen hat.

Allen, die ich hier nicht persönlich erwähnt habe – möchte ich herzlich danken für die vielen wichtigen Ratschläge und schönen Inkubationspausen/Kaffeepausen.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern der Klinik für Gastroenterologie, Campus Virchow Klinikum, den Mitarbeitern der Chirurgischen Klinik, Campus Virchow Klinikum und den Mitarbeitern des Klinikums Westend, Chirurgische Abteilung, für die Hilfe bei der Bereitstellung der Proben.

Schließlich danke ich noch meiner Familie und allen Freunden, die mich stets motiviert und unterstützt haben und so sehr zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

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

Eidstattliche Erklärung

„Ich, Christiane Bielecki erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Durchflusszytometrische Charakterisierung dendritischer Zellen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen - selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift