Effektorphase der intestinalen Immunantwort: Regulation durch Interleukin-18 und Leptin

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Experimentelle Medizin

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Britta Siegmund

geboren am 25.10.1971 in Ehringshausen

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

eingereicht: Mai 2005

Gutachter:
1. Herr Prof. Dr. med. J. Schölmerich
2. Herr Prof. Dr. med. K. Pfeffer

Inhaltsverzeichnis

Seite

1 EINLEITUNG 1

1.1 ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE CHRONISCH ENTZÜNDLICHER DARMERKRANKUNGEN 1
1.1.1 Umweltfaktoren 1
1.1.2 Genetische Prädisposition 2
1.1.3 Mukosales Immunsystem und Dysregulation bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen 3

1.2 TIERMODELLE DER EXPERIMENTELLEN KOLITIS 9
1.2.1 Dextran-Sodium-Sulfat-induzierte Kolitis 9
1.2.2 Trinitrobenzen-Sulfonsäure-induzierte Kolitis 11
1.2.3 Interleukin-10 knockout-Tiere 11
1.2.4 $CD4^{+}CD45Rb^{high}$-Transfer Kolitis 11

1.3 INTERLEUKIN-18 UND „INTERLEUKIN-1β CONVERTING ENZYME“ 12
1.3.1 Interleukin-18 12
1.3.2 „Interleukin-1β converting enzyme“ 13
1.3.3 Regulation des „interleukin-1β converting enzyme“ 14
1.3.4 Interleukin-18 und die intestinale Entzündung 14
1.3.5 Zielsetzung und Fragestellung Teil 1 16

1.4 LEPTIN: EIN HORMON ALS IMMUNREGULATOR 17
1.4.1 Leptin als Hormon 17
1.4.2 Leptin: Funktion im Immunsystem 17
1.4.3 Leptin-/Leptin-Rezeptor-Defizienz in der Maus 20
1.4.4 Leptin-/Leptin-Rezeptor-Defizienz im Menschen 20
1.4.5 Zielsetzung und Fragestellung Teil 2 23

2 EIGENE ARBEITEN 24

2.1 DIE FUNKTION VON INTERLEUKIN-18 IN DER INTESTINALEN ENTZÜNDUNG UND THERAPEUTISCHE STRATEGIEN 24
2.1.1 Die Interleukin-18-Neutralisation mildert die experimentelle Kolitis 24
2.1.2 Die Rolle des “interleukin-1β converting enzyme” in der intestinalen Entzündung 25
2.1.3 Die pharmakologische Inhibition von ICE schützt vor experimenteller Kolitis 26

2.2 CHARAKTERISIERUNG DER FUNKTION VON LEPTIN IM MUKOSALEN IMMUNSYSTEM 27
2.2.1 Leptin-Defizienz, nicht die Adipositas, schützt Mäuse vor der Concanavalin A-induzierten Hepatitis 27
2.2.2 Leptin: Ein entscheidender Mediator in der intestinalen Entzündung 28
2.2.3 Der Leptin-Rezeptor auf T-Zellen moduliert die chronisch intestinale Entzündung 29
2.2.4 Entwicklung einer intestinalen Entzündung in Interleukin-10-/Leptin-Doppelknockout-Mäusen 30

3 DISKUSSION 31

3.1 INTERLEUKIN-18 ALS PRO-INFLAMMATORISCHER MEDIATOR IN DER INTESTINALEN ENTZÜNDUNG 31
3.1.1 Interleukin-18-Neutralisation in der experimentellen Kolitis 31
3.1.2 Das „interleukin-1β converting enzyme“ als anti-inflammatorischer Angriffspunkt in der intestinalen Entzündung 33
3.1.3 Einordnung von Interleukin-18 in die Effektoranwtort 34

3.2 LEPTIN ALS MEDIATOR IN DER INTESTINALEN ENTZÜNDUNG 36
3.2.4 Die Leptin-Defizienz, nicht aber die Adipositas, ist für die Protektion verantwortlich 38
3.2.5 Leptin-Defizienz bei der intestinalen Entzündung 39
3.2.6 Lokale Leptin-Produktion im entzündlichen Infiltrat 42
3.2.7 Leptin bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beim Menschen 44
3.2.8 Einordnung von Leptin in die Effektoranwtort 45

4 ZUSAMMENFASSUNG 47

5 LITERATURVERZEICHNIS 50

6 DANKSAGUNG 66

Abkürzungsverzeichnis

Ak ..... Antikörper
APC..... Antigen-präsentierende Zelle
CARD ..... Caspase-Rekrutierungs-Domäne
Con A ..... Concanavalin A
DC..... dendritische Zellen
db ..... Leptin-Rezeptor-Gen
db/db ..... Leptin-Rezeptor-defiziente Mäuse
DSS ..... Dextran-Sodium-Sulfat
DTH ..... verzögerte Immunantwort („delayed type hypersensitivity“)
EAE..... Autoimmunenzephalomyelitis
GTG ..... Gold-Thioglukose
ICE ..... „interleukin-1β converting enzyme“
IFNγ..... Interferon-γ
IL..... Interleukin
IL-10 KO *ob/ob* ..... IL-10- Leptin-defiziente Doppel-knockout-Tiere
IL-18BP..... „interleukin-18-binding protein“
JAK2 ..... „janus-family tyrosine kinase-2“
kDa..... Kilodalton
KO..... knockout
LMNC ..... mononukläre Zellen der Leber
LPMC..... Lymphozyten der Lamina propria
LPS..... Lipopolysaccharid
LT ..... Lymphotoxin
MDR1 ..... „mutliple drug resistance 1“-Gen
MIP-1α ..... „macrophage inflammatory protein-1α“
MIP-2 ..... „macrophage inflammatory protein-2“
NF-κB..... nukleärer Faktor-κB
NK-Zellen ..... Natürliche Killer-Zellen
NO..... Stickstoffmonoxid
ob ..... Leptin-Gen
ob/ob ..... Leptin-defiziente Mäuse
OB-R ..... Leptin-Rezeptor

OB-Ra, c, d, f..... kurze Isoformen des OB-R

OB-Rb ..... lange Isoform des OB-R

OB-Re ..... lösliche Isoform des OB-R

PPARγ ..... „ peroxisome proliferator activated receptor γ"

PRR..... „pattern recognition receptor“

scid..... „*severe combined immunodeficiency*“

SNP ..... „single nucleotide polymorphism“

STAT..... „signal transducer and activator of transcription“

TGF-β..... „transforming growth factor-β“

Th1 ..... T-Helferzellen Typ 1

Th2..... T-Helferzellen Typ 2

TLR..... Toll-like-Rezeptoren

TNBS ..... Trinitrobenzen-Sulfonsäure

TNFα..... Tumor-Nekrose-Faktor-α

WT ..... Wildtyp

WT GTG ..... Wildtyp-Tiere, denen Gold-Thioglukose intravenös verabreicht wurde

1 Einleitung

1.1 Ätiologie und Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Die Ätiologie und Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen bleiben in vielerlei Hinsicht unklar. Untersuchungen der letzten Jahre zeigen, dass bestimmte Umweltfaktoren bei vorliegender genetischer Prädisposition zu einer Dysregulation des mukosalen Immunsystems und damit zu einer Entzündungsreaktion führen. Die beiden Hauptvertreter chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa stellen somit multifaktorielle Erkrankungen dar.

Im Folgenden wird auf die einzelnen Risikofaktoren eingegangen. Ein besonderer Schwerpunkt wird hierbei auf die Einordnung der eigenen Daten in die Dysregulation des mukosalen Immunsystems gelegt.

1.1.1 Umweltfaktoren

Nach den Beobachtungen aus der Epidemiologie - Inzidenzanstieg in den Nachkriegsjahren und erhöhtes Vorkommen in industrialisierten Gesellschaften – konzentrierte sich die epidemiologische Forschung weitgehend auf die mit dem westlichen Lebensstil assoziierten Faktoren (1). Die ethnische Zugehörigkeit scheint, Studien aus Bevölkerungen mit hohem Immigrantenanteil zu Folge, ebenfalls entscheidend zu sein. Diese Studien zeigen jedoch auch, dass komplexe Interaktionen zwischen genetischer Disposition und Umweltfaktoren unterschiedlicher Art eine Rolle spielen. Sowohl in den USA als auch in Europa ist ein *Nord-Süd-Gefälle* in der Inzidenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen nachweisbar (2, 3). In Ländern außerhalb Europas und Nordamerikas treten chronisch entzündliche Darmerkrankungen sehr viel seltener auf (4, 5). Interessanterweise zeigt sich in Japan und Korea ein zu den westlichen Ländern parallel verlaufender Inzidenzanstieg. Ebenfalls mehrfach gezeigt wurde, dass Patienten mit Morbus Crohn vermehrt unter überdurchschnittlich guten sanitären Verhältnissen aufwuchsen (6, 7). Die hierauf basierende *„sheltered child"-Hypothese* besagt, dass frühkindliche enterische Infektionen durch die verbesserten hygienischen Bedingungen vermieden oder aufgehoben werden. Bei späterer Infektion reagiert das Immunsystem dann bei entsprechend prädisponierten Patienten inadäquat. *Nikotin* beeinflusst die Colitis ulcerosa und den Morbus Crohn unterschiedlich. Während Rauchen mit einem zweifach

erhöhten Risiko an Morbus Crohn zu erkranken assoziiert ist, erscheint das Erkrankungsrisiko bei Rauchern an Colitis ulcerosa deutlich vermindert (8).

1.1.2 Genetische Prädisposition

Die Grundlage der genetischen Exploration der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist die immer wieder dokumentierte familiäre Häufung (bei ca. 10% der Patienten) und die hohe Konkordanz in monozygoten Zwillingen (50-60% gegenüber 4% in dizygoten Zwillingen) (9, 10). Auch in großen Familien konnte kein Mendelscher Erbgang gefunden werden. Daher wird eine polygenetische Ätiologie angenommen, wobei ein genetisches Risiko durch die additive Interaktion multipler Krankheitsgene gebildet wird. Genomweite Untersuchungen weisen für den Morbus Crohn mögliche krankheitsassoziierte Loci auf den Chromosomen 5, 14 und 16, für die Colitis ulcerosa auf dem Chromosom 12 und für beide gemeinsam auf den Chromosomen 1, 6 und 19 auf (11).

Ein Durchbruch war 2001 die Identifikation des ersten Krankheitsgens auf Chromosom 16 dem *NOD2*. Drei Varianten, d. h. so genannte „single nucleotide polymorphisms“ (SNP) im *NOD2*-Gen (neue Nomenklatur „Caspase-Rekrutierungs-Domäne-15“ (CARD15)) sind mit dem Auftreten des Morbus Crohn assoziiert (12-15). Interessanterweise konnte diese Assoziation bislang nur bei westlichen Populationen nachgewiesen werden, wohingegen in Japan für keine der drei beschriebenen Varianten eine Assoziation gezeigt werden konnte (16). Homozygote Träger dieser Allele haben ein 40-fach erhöhtes Risiko an einem stenosierenden Morbus Crohn zu erkranken, charakteristischerweise mit einem Befall des terminalen Ileums (17). NOD2 ist ein intrazelluläres Molekül, welches bakterielle Peptidoglykane erkennt und die von dem nukleären Faktor-κB (NF-κB) abhängige Signaltransduktion reguliert. Es liegen bislang drei Arbeiten zur Klärung des genauen Mechanismus vor: In der ersten Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei einer *NOD2*-Defizienz (*CARD15*-Mutation) zu einer „Toll-like Rezeptor“ (TLR) 2-abhängigen NF-κB-Aktivierung und nachfolgenden Hochregulation der Th1-Antwort kommt (18). In der zweiten Arbeit von Kobayashi und Kollegen sind die *NOD2*-defizienten Tiere gegenüber oralen bakteriellen Infektionen empfindlicher, NOD2 scheint für die Expression einer Subgruppe intestinaler anti-mikrobieller Peptide verantwortlich zu sein (19). Damit übereinstimmend ist bei Patienten mit Morbus Crohn die NOD2-Mutation mit einer verminderten mukosalen α-Defensin-Expression assoziiert (20). Im Gegensatz dazu weisen in der dritten Arbeit Mäuse mit einer Mutation im *NOD2*-Gen eine Zunahme der NF-κB-

Aktivierung nach Stimulation mit bakteriellen Peptidoglykanen auf, assoziiert mit einer vermehrten IL-1β-Expression (21). Die beschriebenen Widersprüche sind am ehesten durch die Verwendung unterschiedlicher experimenteller Systeme zu erklären, sodass die endgültige Klärung des Mechanismus eine spannende Fragestellung bleibt.

Es sind drei weitere SNP beschrieben. Erstens, ein weiterer SNP in einem „pattern recognition receptor" (PRR) ist der TLR-4-Polymorphismus, der mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Lipopolysaccharid (LPS) assoziiert ist. Dieser tritt gehäuft sowohl bei Patienten mit Morbus Crohn als auch Colitis ulcerosa auf (22). Zweitens, der SNP auf dem Chromosom 10 ist das DLG5. Dieses ist ein Strukturprotein, welches entscheidend für die Integrität des Epithels ist. Dieser SNP tritt gehäuft bei Morbus Crohn auf (23). Drittens, ein SNP in dem „multi drug resistance 1"-Gen (*MDR1*), für dessen Genprodukt, das P-Glykoprotein, eine erhöhte Expression in intestinalen Epithelzellen nachgewiesen wurde. Wie in dem Abschnitt „*Tiermodelle der experimentellen Kolitis*" beschrieben, entwickelt die *MDR1a* knockout (KO)-Maus spontan eine Kolitis, welche durch Antibiotika verhindert werden kann, was auf eine Barrierestörung hindeutet. Der MDR1-SNP ist mit einer verminderten Expression des P-Glykoproteins assoziiert und tritt mit erhöhter Frequenz bei Patienten mit Colitis ulcerosa auf (24).

1.1.3 Mukosales Immunsystem und Dysregulation bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Das intestinale Immunsystem stellt eine komplexe Interaktion verschiedenster immunkompetenter Zellen innerhalb der Mukosa dar. Mit Hilfe des nachfolgenden Schemas (Abbildung 1) sollen die beteiligten Zellpopulationen und Mediatoren sowie ihre Interaktionen und die Bedeutung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen dargestellt werden.

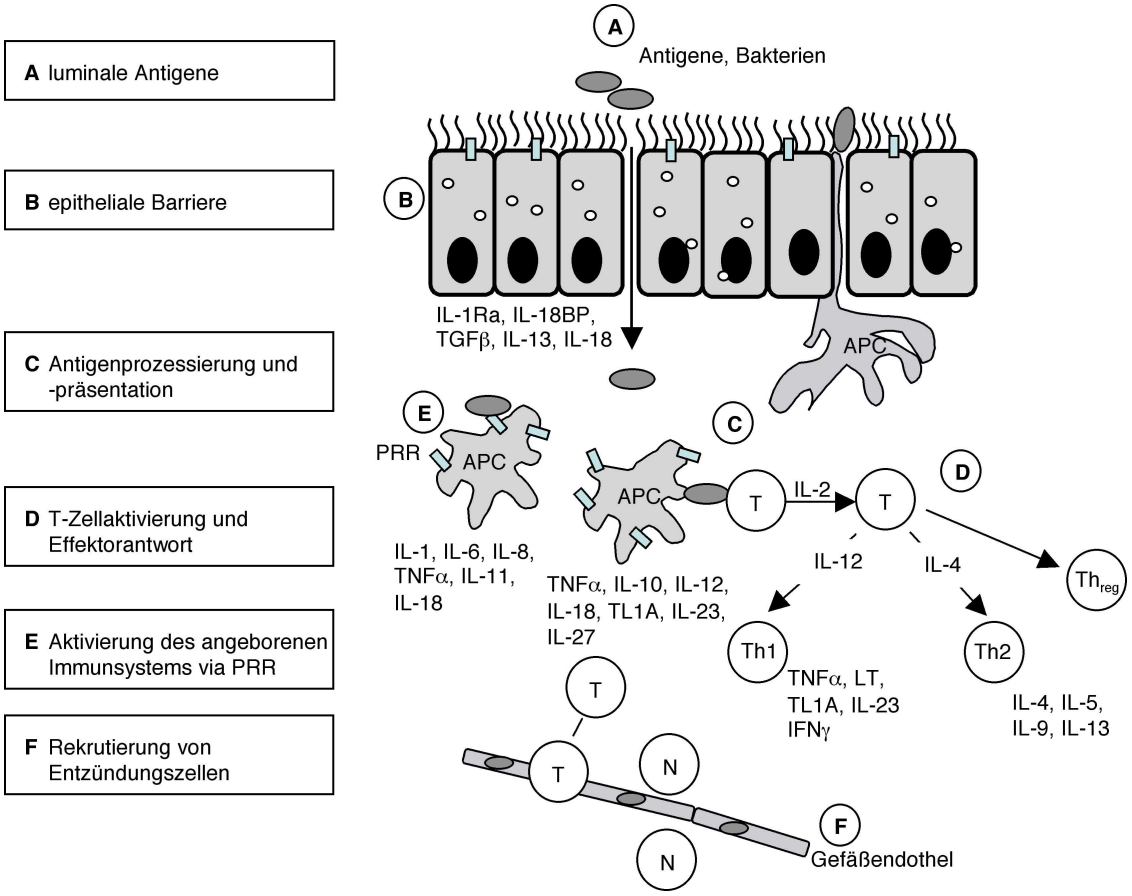

Abbildung 1. Mukosale Entzündungsreaktionen. Die verschiedenen, an der Entzündungsreaktion beteiligten Zellpopulationen und ausgewählte Mediatoren sind dargestellt. Die einzelnen Schritte sind im nachfolgenden Text detailliert erläutert. (APC = Antigen-präsentierende Zelle; T = T-Zelle, N = neutrophile Granulozyten; PRR = „pattern recognition receptor"; LT = Lymphotoxin).

A *Luminale Antigene*

Es konnte bislang kein einzelnes Bakterium als Ursache für den Morbus Crohn oder die Colitis ulcerosa identifiziert werden. Befunde aus der Literatur sprechen jedoch für eine Rolle der intestinalen Flora und der intraluminalen Antigene im Entzündungsprozess. Verschiedene Pathogene (zum Beispiel *Salmonellen*, *Shigellen*, *Campylobacter*) könnten chronisch entzündliche Darmerkrankungen dadurch auslösen, dass sie eine Entzündungsreaktion hervorrufen, die durch das intestinale Immunsystem nicht mehr kontrolliert werden kann. Darüber hinaus wird wahrscheinlich die normale intestinale Flora bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen als pathogen empfunden. Anaerobe Keime, speziell *Bacteroides spp.*, scheinen verantwortlich für die Auslösung der Entzündung zu sein. Diese Hypothesen werden durch das Ansprechen von Patienten mit Morbus Crohn auf Therapien, welche die intestinale Flora beeinflussen, wie Metronidazol, Ciprofloxazin oder Elementardiäten, unterstützt (25). Andererseits üben so genannte *Probiotika*, wie *Lactobacillus spp.*, sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen einen anti-inflammatorischen Effekt aus (26, 27). Bei Gesunden führt die

intestinale Flora sowie die intraluminalen Antigene zu keiner Aktivierung des mukosalen Immunsystems, d. h. T-Zellen aus der Mukosa gesunder Personen können mit luminalen Antigenen nicht stimuliert werden. Im Gegensatz dazu können mukosale T-Zellen von Patienten mit Morbus Crohn durch die luminalen Antigene stimuliert und zur Proliferation gebracht werden (28).

B/C *Epitheliale Barriere und Antigenprozessierung*

Für eine *Antigenprozessierung* ist eine transepitheliale Antigenaufnahme im Kolon erforderlich, d. h. die *epitheliale Barriere* muss überwunden werden (29). Für diesen Prozess gibt es aktuell vier beschriebene Mechanismen. Erstens können die epithelialen M-Zellen luminale Antigene direkt an die basal des Epithels liegenden dendritischen Zellen (DC) transportieren (30). Jedoch ist die Anzahl der M-Zellen im Epithel gering und es ist wahrscheinlich, dass es durch den transzellulären Transport zu einer vorzeitigen intrazellulären Degradierung der Antigene kommt. Als zweiter Mechanismus konnte für DC gezeigt werden, dass sie unter Einsatz ihrer dendritischen Ausläufer über den interepithelialen Weg Antigene aufnehmen und prozessieren können (31). Diese DC sind charakterisiert durch folgenden Phänotyp: $CD11c^{+}CD8\alpha^{-}CD11b^{+}$. Ihre Präsenz im terminalen Ileum lässt vermuten, dass eine zunehmende Bakterienanzahl diese Zellen dorthin rekrutiert. Dieser DC-Subtyp induziert Antigen-spezifische T-Zellen zu einer T-Helferzellen-Typ 2 (Th2)-Polarisation sowie zu einer Interleukin (IL)-6-vermittelten Antikörper-Produktion. Ebenso im terminalen Ileum konnten $CD11c^{+}CD8\alpha^{-}CD11b^{-}$ DC nachgewiesen werden, welche Bakterien enthalten und konstitutiv IL-12p40 exprimieren, das zusammen mit p19 das pro-inflammatorische IL-23 bildet (32). Da IL-23 eine T-Helferzellen Typ 1 (Th1)-polarisierte Immunantwort unterstützt, könnte diese Lokalisation im terminalen Ileum auf die Prädisposition dieser Region für einen Morbus Crohn hindeuten. Der dritte Weg der Antigenaufnahme wird durch den neonatalen Fc-Rezeptor vermittelt, der auf humanen intestinalen Epithelzellen exprimiert wird. Sobald Immunglobulin G plus gebundenes Antigen an den Fc-Rezeptor bindet, wird dieser Komplex transepithelial nach basal transportiert und dort DC präsentiert (33). Dieser Komplex ist weniger empfindlich in Bezug auf eine intrazelluläre Degradierung. Viertens können DC der Lamina propria Antigene von apoptotischen epithelialen Zellen prozessieren (34).

In dem Modell der Transfer-Kolitis nehmen DC in zweierlei Hinsicht eine entscheidende Funktion ein, zum einen in der Induktion der Th1-Antwort und damit der Entzündungsreaktion, zum anderen die Steuerung der regulatorischen Gegenantwort. Direkt nach der Kolitis-Induktion zeigt sich eine Zunahme von DC mit dem Phänotyp $CD11c^{hi}CD11b^{+}CD8\alpha^{-}CD134L^{+}$ in den mesenterialen Lymphknoten, diese scheinen für die Expansion der Entzündung-induzierenden T-Zellpopulation kritisch zu sein (35). Weiter kann eine Subpopulation von DC in den mesenterialen Lymphknoten und der Milz gefunden werden, die das Integrin CD103 exprimiert. In dem Modell der Transfer-Kolitis kann durch den parallelen Transfer von $CD45Rb^{low}CD25^{+}$-regulatorischen T-Zellen sowohl die Entstehung der Kolitis verhindert werden, als auch eine bereits etablierte Kolitis behandelt werden (36). CD103 scheint hierfür essentiell zu sein, nachdem der Transfer von $CD45Rb^{low}CD25^{+}$-Zellen in CD103-defiziente Empfänger den Verlauf der Kolitis nicht beeinflusst (29, 36).

D *T-Zellaktivierung und Effektorantwort*

Die T-Zellaktivierung in der Lamina propria durch DC ist ein physiologischer Prozess, der kontinuierlich stattfindet. Durch diese Antigenpräsentation wird in der gesunden Mukosa eine Toleranz induziert, vermittelt durch die Polarisation von naïven T-Zellen zu regulatorischen sowie Th1- und Th2-Zellen (29). In der Lamina propria kommt es neben der Polarisation zu regulatorischen T-Zellen gleichzeitig zu einer Polarisation zu Th1- bzw. Th2-Zellen. Eine Entzündungsreaktion wird jedoch durch ein Gleichgewicht dieser verschiedenen T-Zellpopulationen verhindert. Wie in den vorherigen Abschnitten bereits diskutiert, kommt es unter bestimmten prädisponierenden Faktoren zur Dominanz einer polarisierten T-Zellsubpopulation, die eine Entzündungsreaktion nach sich zieht. Diese polarisierten T-Zellen vermitteln wiederum die Freisetzung verschiedenster Mediatoren aus den benachbarten Zellen, aber auch die Rekrutierung weiterer Entzündungszellen in dieses Areal. Hieraus ergibt sich ein komplexes Netzwerk von Mediatoren, die an dem Entzündungsprozess beteiligt sind. Das Verständnis der Interaktion dieser Mediatoren stellt einen ganz wesentlichen Schwerpunkt aktueller Forschungsbemühungen dar, da sich hier therapeutische Interventionen anbieten.

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind durch charakteristische Mediatorprofile gekennzeichnet. So ist die mukosale Entzündung bei Patienten mit Morbus Crohn durch eine Dominanz der so genannten Th1-Zytokine charakterisiert (1). Dass es sich hierbei

nicht nur um eine deskriptive Hochregulation einzelner Mediatoren handelt, sondern diese in der Tat für den Entzündungsprozess von Relevanz sind, konnte durch Neutralisationsversuche zunächst im Tiermodell und dann auch im Menschen gezeigt werden (37, 38). Wie in Abbildung 1 dargestellt, ist IL-12 das entscheidende Zytokin für die Th1-Polarisation. Damit übereinstimmend konnte bereits 1995 im Tiermodell gezeigt werden, dass eine Neutralisation von IL-12 mit einer kompletten Protektion in der experimentellen Kolitis assoziiert ist (39). Knapp zehn Jahre später wurden diese Befunde an einer ersten, kürzlich publizierten Pilotstudie bei Patienten mit Morbus Crohn bestätigt (38). Das zweite Zytokin, dessen Neutralisation bereits für eine Subgruppe von Patienten mit Morbus Crohn klinisch etabliert ist, ist der Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNFα), dessen Produktion wird zum einen durch eine Th1-Polarisation induziert, zum anderen wird TNFα auch primär durch DC produziert (Abbildung 1) (37). Im Tiermodell konnte auch hier eine Protektion für die TNFα-Neutralisation gezeigt werden (40).

Neben IL-12 und TNFα sind eine Vielzahl weiterer Mediatoren an der Effektorantwort beteiligt, wovon ausgewählte Faktoren in Abbildung 1 eingefügt sind. IL-18 wurde in die Abbildung bereits aufgenommen, die Funktion von IL-18 wird nachfolgend in den eigenen Ergebnissen detailliert erläutert. Auf die Rolle des IL-12-Homologs IL-23 ist in dem Abschnitt „*Epitheliale Barriere und Antigenprozessierung*“ bereits eingegangen worden. TL1A ist ein neues Mitglied der TNF-Superfamilie, das sowohl von DC, aber auch von Th1-Zellen gebildet wird. TL1A nimmt eine kostimulatorische Funktion in der IFNγ-Induktion ein. Eine Hochregulation von TL1A konnte in entzündeten Arealen bei Patienten mit Morbus Crohn nachgewiesen werden (41).

Im Gegensatz dazu weisen Patienten mit Colitis ulcerosa erhöhte Konzentrationen von Th2-Zytokinen auf. Das Schlüsselzytokin für die Th2-Polarisation ist das IL-4 (42-44). In Tiermodellen der Colitis ulcerosa konnten erfolgreich anti-IL-4-Strategien eingesetzt werden (45). In bestimmten Situationen kann auch durch ein weiteres Zytokin, das IL-13, die Th2-Polarisation induziert werden (46). Damit übereinstimmend konnte durch Neutralisation von IL-13 im Tiermodell die Entzündung verhindert werden (47).

Die Regulation dieses Netzwerkes wird noch komplexer durch die Induktion von Mediatoren aus umliegenden Geweben. Nur durch Neutralisationsversuche und Charakterisierung der einzelnen, den entsprechenden Mediator produzierende

Zellpopulation, ist eine Einordnung in das Netzwerk möglich. Mit der vorliegenden Arbeit sollen zwei Mediatoren dieses Netzwerkes auf ihre Bedeutung im Entzündungsprozess genauer untersucht werden. Auf beide Mediatoren, das Zytokin IL-18 und das Hormon Leptin, wird in den Abschnitten *1.3* und *1.4* detailliert eingegangen.

E *Pattern Recognition Rezeptoren*

Die TLR-vermittelte Signaltransduktion wird auf zwei Ebenen vermittelt, zum einen durch das Epithel und zum anderen in der Lamina propria (48). Auf Seiten des Epithels kann die Signaltransduktion sowohl auf der apikalen Seite, z. B. durch TLR-4, als auch auf der basolateralen Seite sowie auch innerhalb der Zelle, wie z. B. durch TLR-9 vermittelt werden. Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass die physiologischen intraluminalen Antigene zytoprotektive Mediatoren induzieren, sowohl auf Ebene der Epithelzellen, als auch auf Ebene der DC und so ein Gleichgewicht aufrechterhalten (48). Trotzdem kann der TLR-vermittelten Signaltransduktion keine alleinige protektive Funktion zugeschrieben werden. Z. B. entsteht in konditionalen „signal transducer and activator of transcritpion“ (*STAT*)-3 KO Mäusen, die normalerweise eine spontane Kolitis entwickeln, diese nicht, wenn die Tiere gleichzeitig TLR-4 defizient sind (49). Weiter kann in Mäusen, die keimfrei gezüchtet werden kaum eine experimentelle Kolitis induziert werden (50). Folglich muss von einer Aktivierung der TLR-Signaltransduktion als einer der ersten Schritte in der mukosalen Entzündung ausgegangen werden.

F *Rekrutierung von Entzündungszellen*

Die Rekrutierung von Entzündungszellen aus dem peripheren Blut erfolgt über die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Gefäßendothelzellen und Zellen des Immunsystems wie z. B. DC oder T-Zellen (51). Es können drei Gruppen von Adhäsionsmolekülen unterschieden werden: Die Immunglobulin-Superfamilie (z. B. ICAM-1 auf Monozyten und Endothelzellen, VCAM auf Lymphfollikeln), die Integrine (z. B. LFA-1 auf Leukozyten, MAdCAM-1 auf Endothelzellen) und die Selektine (z. B. ELAM-1 auf Endothelzellen). Die Adhäsion erfolgt in verschiedenen Stufen. Die Selektine sind für den primären Kontakt von Entzündungszellen und Endothelzellen durch nicht-kovalente Bindungen verantwortlich. Diese primäre Adhäsion führt zur Hochregulation von Integrinen auf Entzündungszellen, die dann mit Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie interagieren und zur Migration der Entzündungszellen in das Gewebe führen (52, 53).

Die Expression zahlreicher Adhäsionsmoleküle ist bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöht. Dabei könnte MAdCAM-1 von besonderem Interesse sein, da dieses Integrin mukosaspezifisch exprimiert wird. So konnte in einem experimentellen Kolitismodell eine deutliche Suppression der Entzündung durch Blockade der Leukozyten-Endothel-Interaktion durch Antikörper gegen MAdCAM bzw. gegen den MAdCAM-Liganden das Integrin $\alpha 4\beta 7$ oder Antisense gegen ICAM-1 erreicht werden (54). Diese Ergebnisse wurden in klinische Studien mit ICAM-1-Antisense-Oligonukleotiden bei Morbus Crohn umgesetzt (55). Eine signifikante Wirksamkeit dieser Antisense-Strategie konnte hiermit nicht erzielt werden. Eine prospektive, randomisierte Therapiestudie mit Natalizumab, einem Antikörper gegen das Integrin $\alpha 4$, ergab dagegen einen Wirksamkeit dieser Substanz bei Morbus Crohn (56).

1.2 Tiermodelle der experimentellen Kolitis

Es existieren eine Vielzahl von Modellen für die experimentelle Kolitis in der Maus. Diese Modelle stellen keine Kopie der humanen Erkrankungen dar, ermöglichen aber die Charakterisierung der Entzündungsreaktion und tragen damit ganz wesentlich zu dem Verständnis der Pathophysiologie bei. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die wesentlichen Tiermodelle in der Maus. Es werden im Anschluss die in unseren Arbeiten verwendeten Tiermodelle sowie ihre Besonderheiten beschrieben.

1.2.1 Dextran-Sodium-Sulfat-induzierte Kolitis

Das Modell der Dextran-Sodium-Sulfat (DSS)-induzierten Kolitis wurde erstmals im Jahre 1985 in Hamstern beschrieben (57). Die Übertragung auf die Maus wurde fünf Jahre später von Okayasu publiziert (58). In diesem Modell wird das Polysaccharid DSS im Trinkwasser gegeben, dies führt zu einer Zerstörung der epithelialen Barriere im Kolon (59). Luminale Antigene werden von Antigen-präsentierenden Zellen prozessiert und T-Zellen aktiviert (60). Auch wenn DSS in „*severe combined immunodeficiency*“ (*scid*)-Mäusen eine Kolitis induzieren kann, ist mittlerweile nicht mehr bestritten, dass aktivierte T-Zellen entscheidend zu der Entzündungsreaktion beitragen (61, 62). So ist eine Therapie mit Cyclosporin aber auch mit FK506 in diesem Modell protektiv (63, 64). Die Neutralisation verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine (TNFα, IL-6) (65, 66), aber auch die Applikation des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10, übt einen protektiven

Effekt in diesem Modell aus (67). Darüber hinaus konnte kürzlich gezeigt werden, dass bestimmte T-Zellsubpopulationen ebenfalls eine anti-inflammatorische Wirkung aufweisen (68).

Tabelle 1. Übersicht der Tiermodelle für experimentelle Kolitis in der Maus (nach (50)).

Modelle	**Literatur**
1 genetisch veränderte Tiere	
C3H/HeJBir	(69)
IL-2 KO	(70)
IL-10 KO	(71)
TCRα KO	(72)
TGFβ1 -/-	(73, 74)
TNFΔARE	(75)
SAMP1/Yit	(76)
Gi2α KO	(77)
T-bet transgen	(78)
STAT4 transgen	(79)
IL-7 transgen	(80)
Mdr1a KO	(81)
2 Immundefizienz	
$CD4^{+}CD45Rb^{high}$-Transfer	(82)
Tgε26 Knochenmarkschimäre	(83)
Wiskott-Aldrich-Protein-Defizienz	(84)
3 Induktion durch exogene Substanzen	
Dextran-Sodium-Sulfat	(57, 58)
Trinitrobenzen-Sulfonsäure	(85)
Oxazolon	(45)
Carageenan	(86)

Es existieren grundsätzlich zwei Schemata der DSS-Applikation: Erstens, das Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis, bei dem DSS kontinuierlich über einen Zeitraum von fünf bis zehn Tagen appliziert wird (58). Zweitens, das Modell der chronischen DSS-induzierten Kolitis, hier wird DSS in niedrigerer Konzentration in drei bis vier Zyklen gegeben, unterbrochen von Zyklen mit normalem Trinkwasser (62, 87).

Der wesentliche Vorteil des DSS-Modells ist, dass die Varianz der Krankheitsausprägung in den einzelnen Gruppen im Vergleich zu anderen Modellen sehr gering ist und damit der Kolitisverlauf sehr gut zu steuern ist (61, 88).

1.2.2 Trinitrobenzen-Sulfonsäure-induzierte Kolitis

Das zweite verwendete Modell ist die Trinitrobenzen-Sulfonsäure (TNBS)-induzierte Kolitis. Dieses Modell wurde erstmals 1989 beschrieben (85). Aber erst 1995 konnte durch Neurath und Kollegen gezeigt werden, dass die rektale Gabe in 50%gen Ethanol zu einer transmuralen Kolitis führt, die eine Th1-abhängige Entzündungsantwort darstellt (39). Es handelt sich hierbei um eine antigenspezifische Form der Kolitis, da sie durch das Hapten TNBS ausgelöst wird. Durch Neutralisation von IL-12 konnte die TNBS-induzierte Kolitis komplett verhindert werden (39). Neben der Suppression von IL-12-induzierten pro-inflammatorischen Zytokinen, die mit einer Protektion assoziiert ist (40, 89, 90), scheint hierfür eine Apoptoseinduktion an dem anti-inflammatorischen Mechanismus beteiligt zu sein (91).

1.2.3 Interleukin-10 knockout-Tiere

Bereits vor der Generierung der IL-10 KO-Tiere konnte gezeigt werden, dass IL-10 ein anti-inflammatorisches Zytokin ist und *in vitro* eine Reihe von pro-inflammatorischen Zytokinen, die von Antigen-präsentierenden Zellen, T-Zellen, Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) produziert werden, supprimiert (92, 93). 1993 wurde erstmals beschrieben, dass es bei IL-10 KO-Tieren zu der spontanen Entwicklung einer Kolitis kommt. Es handelt sich hierbei um eine diskontinuierliche, transmurale Entzündung, die sowohl Kolon als auch Dünndarm betrifft (71). Zunächst glaubte man, dass ausschließlich eine dominierende Th1-Antwort für die Entzündung verantwortlich ist (71). Untersuchungen der letzten Jahre zeigen jedoch, dass dies zwar in der Anfangsphase der Entzündung zutrifft, dass aber in der Spätphase eine Th2-Antwort für den Entzündungsprozess entscheidend ist (94).

1.2.4 $CD4^+CD45Rb^{high}$-Transfer Kolitis

Dieses Modell wurde erstmals 1993 von Powrie und Kollegen beschrieben. Hierbei werden naïve T-Zellen ($CD4^+CD45Rb^{high}$) aufgereinigt und in *scid*-Mäuse intraperitoneal injiziert (82). In Abhängigkeit des Tierstalls kommt es nach vier bis acht Wochen zur Ausbildung einer transmuralen Kolitis, die histologisch einem Morbus Crohn ähnelt. Der gleichzeitige Transfer von so genannten regulatorischen T-Zellen, die sich in der Population der $CD4^+CD45Rb^{low}$-Zellen befinden, kann die Kolitisentwicklung komplett verhindern (82, 95). Durch die klare Definition einer Effektorpopulation und einer Population

regulatorischer Zellen kann gezielt die Bedeutung verschiedener Faktoren durch entsprechende Transferversuche in diesem Modell untersucht werden. Es handelt sich um eine transmurale Entzündung, die durch IFNγ, IL-12 und TNFα vermittelt wird (95-97). In der Population der regulatorischen Zellen konnten der „transforming growth factor-β" (TGF-β) und IL-10 als die entscheidenden anti-inflammatorischen Zytokine identifiziert werden (98, 99).

Die transferierten $CD4^{+}CD45Rb^{high}$-Zellen migrieren sowohl in den Dünndarm als auch in das Kolon, es wird jedoch nur eine Kolitis beobachtet. Das deutet darauf hin, dass die intraluminale Flora den entscheidenden Stimulus für die Entzündungsreaktion darstellt. Diese Vermutungen werden durch die Befunde unterstützt, dass fast keine Entzündung beobachtet wird, wenn der Zelltransfer in einer gnotobiotischen Umgebung durchgeführt wird (100).

1.3 Interleukin-18 und „interleukin-1β converting enzyme"

1.3.1 Interleukin-18

IL-18 wurde ursprünglich 1989 als Interferon-γ (IFNγ)-induzierender Faktor beschrieben (101). Monozyten und Makrophagen stellen die am Besten charakterisierte Quelle für IL-18 dar (102). Die ursprünglichen Daten stammen aus Mäusen, die mit *Propionibakterium acnes* vorbehandelt wurden, um dann mit LPS *in vivo* stimuliert zu werden. Aus Kupffer-Zellen dieser Tiere wurde IL-18 isoliert und kloniert (101). IL-18 wird zur IL-1-Superfamilie gezählt. Das aktive IL-18 weist in Bezug auf die dreidimensionale Struktur einen hohe Ähnlichkeit zu aktivem IL-1β auf. IL-18 und IL-1β besitzen eine charakteristische β-Faltblattstruktur (103). Vergleicht man die konservierten Aminosäuresequenzen so zeigt sich eine 19%ige Sequenzhomologie zwischen IL-18 und IL-1β (103). Im Gegensatz zu IL-1β wird IL-18 konstitutiv intrazellulär in einer inaktiven pro-Form exprimiert (104). Betrachtet man den Promoter des IL-18-Gens, so ist keine TATA-Box zu finden, damit ist der Promoter proximal des Exon 2 kontinuierlich aktiv (105). Zusätzlich verfügt die 3'-nicht-translatierte Region des humanen IL-18 über keine destabilisierende AUUUA-Sequenz (105).

IL-18 vermittelt das Signal über den IL-18-Rezeptor-Komplex. Dieser besteht aus zwei nicht-identischen Ketten: Einer Liganden-bindenden Kette, dem IL-18-Rezeptor-α und

einer Kette, die keinen Liganden bindet, der IL-18-Rezeptor-β (106-108). IL-18 alleine führt nicht zu einer Induktion von IFNγ und anderen Th1-Zytokinen, jedoch ist in Kombination mit IL-2 oder IL-12 ein Synergismus nachweisbar (109). Der Synergismus zwischen IL-12 und IL-18 und die daraus resultierenden Effekte auf das Immunsystem sind in Abbildung 2 dargestellt.

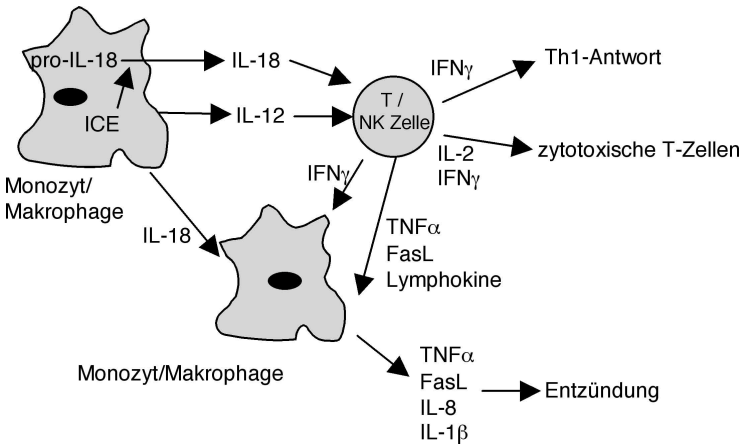

Abbildung 2. Effekte von IL-18 im Immunsystem. Die auf zellulärer Ebene durch IL-18-induzierten Effekte sind schematisch dargestellt und im Text detailliert erläutert (Abbildung modifiziert nach (110)).

1.3.2 „Interleukin-1β converting enzyme“

Das „interleukin-1β converting enzyme“ (ICE) ist Mitglied einer großen Familie intrazellulärer Proteasen, die besser unter dem Namen Caspasen bekannt sind. Caspase steht hierbei für Cystein-Proteasen, die nach der Aspartinsäure schneiden (111). Das *ICE*-Gen kodiert für ein 45 Kilodalton (kDa) großes, inaktives Protein, welches konstitutiv in vielen Zelltypen exprimiert wird. Die Mehrzahl der Caspasen ist an enzymatischen Signalwegen beteiligt, die zur Apoptose führen. Im Gegensatz dazu besteht die Hauptfunktion von ICE in der Prozessierung von IL-1β und IL-18. Wie bei den meisten Caspasen, benötigt der 45 kDa große Vorläufer von ICE zwei interne Spaltungen bevor das enzymatisch aktive Heterodimer entsteht, welches sich aus einer 10 und einer 20 kDa großen Kette zusammensetzt. ICE kann sich selber aktivieren durch Oligomerisation mit sich selber oder anderen Mitgliedern der Caspase-Familie, wie z. B. Caspase-3 (112, 113). Jede Caspase weist eine limitierte Substratspezifität auf, so sind pro-IL-1β und pro-IL-18 als Substrate für ICE identifiziert worden. Die Aktivierung von ICE und die anschließende Aktivierung von IL-1β und IL-18 ist in Abbildung 3 dargestellt.

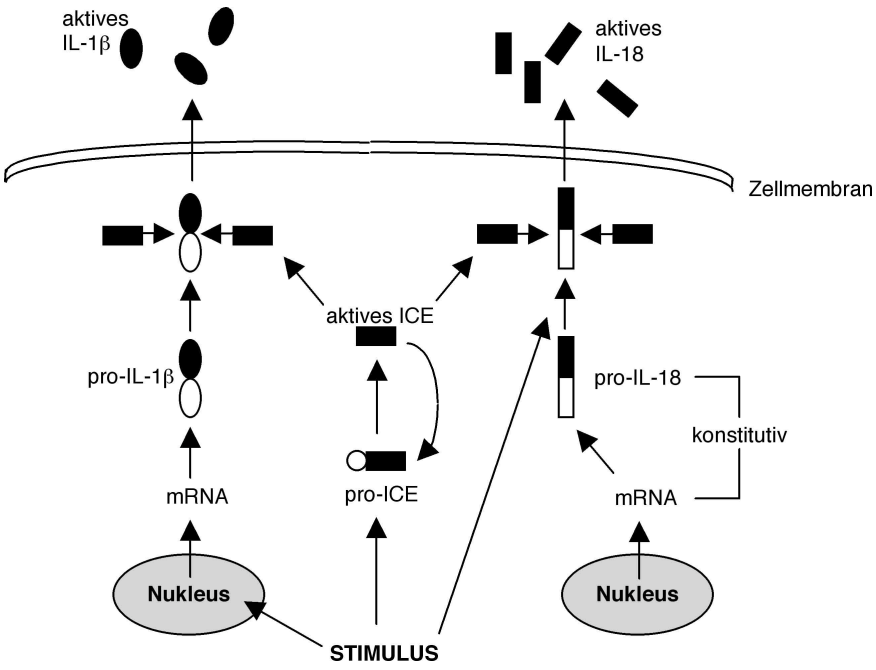

Abbildung 3. IL-1β- und IL-18-Synthese, ICE-Prozessierung und Sekretion. Die im Text beschriebene Aktivierung von ICE und nachfolgende Aktivierung von IL-1β und IL-18 sind schematisch gezeigt (Abbildung modifiziert nach (110)).

1.3.3 Regulation des „interleukin-1β converting enzyme“

Die Aktivierung von ICE ist häufig mit einer generellen Zellaktivierung und parallelen IL-1β- und IL-18-Sekretion assoziiert. Obwohl Endotoxin sowohl ICE aktivieren als auch die Synthese von IL-1β induzieren kann, gibt es auch endogene Zytokine, die diese Eigenschaften besitzen. So kann z. B. der CD40-Ligand, ein Mitglied der TNFα-Superfamilie von Liganden, ICE aktivieren und die Sekretion von IL-1β auf Endothel- und glatten Muskelzellen induzieren (114). IFNγ kann ebenso die ICE-Expression, nicht aber die ICE-Aktivierung, stimulieren (115). Parallel existieren Daten, die auf intrazelluläre Inhibitoren von ICE hinweisen. Einer dieser Inhibitoren ist der Serin-Proteinase-Inhibitor 9, welcher die ICE-Aktivität in kultivierten humanen glatten Muskelzellen hemmen konnte (116). Stickstoffmonoxid (NO) stellt ebenso einen potenten Inhibitor der ICE-Aktivität dar (117, 118). Damit übereinstimmend inhibiert NO die Sekretion von aktivem IL-1β und IL-18 (119).

1.3.4 Interleukin-18 und die intestinale Entzündung

Mehrere Studien deuten auf eine entscheidende Rolle für IL-18 in der intestinalen Entzündung hin. Zunächst bestätigten Nakamura und Kollegen *in vivo* den *in vitro*

beschriebenen Synergismus zwischen IL-12 und IL-18 bezogen auf die Induktion der IFNγ-Synthese (120). Wurde Mäusen IL-18 alleine injiziert, waren keine makroskopischen Veränderungen zu erkennen, wohingegen nach alleiniger IL-12-Injektion die Entwicklung einer Kolitis sowie ein Gewichtsverlust beobachtet werden konnte (120, 121). Die Injektion beider Zytokine resultierte in einer schwersten Kolitis assoziiert mit einer hohen Mortalität. Chikano und Kollegen bestätigten diese Ergebnisse und konnten weiter zeigen, dass die intestinale Entzündung einen IFNγ-abhängigen und TNFα–, NO- und Fas-Ligand-unabhängigen Mechanismus darstellt (122). In Übereinstimmung mit einer erhöhten Th1-Antwort in Patienten mit Morbus Crohn, konnten mehrere Gruppen unabhängig voneinander eine signifikant erhöhte Expression von IL-18 in intestinalen Makrophagen und Epithelzellen in den entzündeten Arealen von Patienten mit Morbus Crohn nachweisen (123, 124). Im Gegensatz dazu wurde in den entzündeten Arealen bei Patienten mit Colitis ulcerosa keine erhöhte IL-18-Expression nachgewiesen (123). Die erhöhte Expression eines Mediators deutet auf eine Funktion im Entzündungsprozess hin, der Beweis, dass es sich um einen kritischen Faktor in der Entzündungskaskade handelt, kann nur durch Neutralisations-Experimente erbracht werden.

1.3.5 Zielsetzung und Fragestellung Teil 1

Die erhöhte Expression von IL-18 in den entzündeten Arealen der Lamina propria von Patienten mit Morbus Crohn, nicht aber Colitis ulcerosa, deutet auf eine kritische Funktion im Mediatornetzwerk der intestinalen Entzündung hin. Diese deskriptiven Befunde werden weiter unterstützt durch *in vitro*- und *in vivo*-Befunde, bei denen IL-18 in Kombination mit IL-12 einen synergistischen Effekt in Bezug auf die pro-inflammatorische Entzündungsantwort aufweist. Durch die Neutralisation von IL-12 kann sowohl im Tiermodell der experimentellen Kolitis, als auch bei Patienten mit Morbus Crohn die Entzündung verhindert beziehungsweise gemildert werden (38, 39).

Die nachfolgenden Arbeiten dienen somit der Charakterisierung der Rolle von IL-18 in der intestinalen Entzündungskaskade, wobei zum einen der Hauptsyntheseort in der Mukosa identifiziert werden soll, zum anderen die Relevanz von IL-18 in dem Entzündungsprozess mittels Neutralisation von IL-18 in der experimentellen Kolitis untersucht wird. Sollte die „IL-18-Blockade“ mit einer verminderten Entzündungsreaktion assoziiert sein, bietet der charakteristische Aktivierungsweg von pro-IL-18 zu dem aktiven Zytokin mittels der Protease ICE einen therapeutischen Ansatzpunkt für pharmakologische Strategien. Diese Möglichkeit soll unter Einsatz von *ICE*-knockout-Tieren bzw. spezifischen Inhibitoren untersucht werden.

Durch diese *in vivo*-Untersuchungen kann IL-18 eine eindeutige Position in dem Mediatornetzwerk der intestinalen Entzündung zugeordnet werden und ermöglicht so zum einen ein besseres Verständnis und zum anderen eröffnet es möglicherweise neue therapeutische Ansatzpunkte.

1.4 Leptin: Ein Hormon als Immunregulator

1.4.1 Leptin als Hormon

In der Mitte des letzten Jahrhunderts wurde in Mäusen ein genetischer Defekt identifiziert, der als Phänotyp eine schwere Adipositas aufweist, die auf eine vermehrte Nahrungsaufnahme und einen verminderten Energieverbrauch zurückzuführen war (125). Das zugehörige Gen wurde *ob* benannt und die die Mutation tragenden Mäuse *ob/ob* (126). Genauere Untersuchungen ergaben, dass *ob/ob*-Mäuse nicht in der Lage sind einen „Sättigungsfaktor" zu produzieren, jedoch auf diesen reagieren können. Ähnliche Experimente wurden in so genannten *db/db*-Mäusen durchgeführt, die eine Mutation im *db*-Gen aufweisen und einen vergleichbaren Phänotyp zeigen. *Db/db*-Mäuse produzierten zwar den in den *ob/ob*-Mäusen fehlenden „Sättigungsfaktor", konnten aber nicht auf ihn reagieren. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass das *db*-Gen für den Leptin-Rezeptor kodiert (125). Erst 1994 wurde der molekulare Defekt in dem *ob*-Gen identifiziert (127). Das 16 kDa große Protein wurde Leptin benannt, nach dem griechischen Word „*leptos*" (λεπτοσ), welches übersetzt dünn heißt.

Adipozyten stellen den Hauptproduzenten von Leptin dar. Die ursprünglich beschriebene Funktion von Leptin ist die appetithemmende Wirkung, daher korrelieren die Leptin-Serumkonzentrationen direkt mit der Körperfettmasse. Zu Beginn einer Fastenperiode fallen die Leptin-Serumkonzentrationen zunächst disproportional ab und signalisieren so dem Gehirn sich an den neuen Nahrungszustand zu adaptieren. Hieraus folgende endokrine Veränderungen schließen eine Verminderung der reproduktiven, thyreoidalen Funktion sowie eine Stimulation der Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-Nebennierenrinden-Achse ein (128). Steigt die Kalorienzufuhr und die Energiedepots normalisieren sich, d. h. die Adipozyten nehmen an Masse zu, so steigt auch die Leptin-Serumkonzentration.

1.4.2 Leptin: Funktion im Immunsystem

Erste Hinweise, dass Leptin neben seiner Rolle als Mediator im neuroendokrinologischen Netzwerk auch als Botenstoff im Immunsystem dient, ergaben sich auf Grund seiner Struktur und der seines Rezeptors. Anhand seines Aufbaus, der vier α-helikale Strukturen beinhaltet, wird Leptin zu den langkettigen helikalen Zytokinen gezählt, einer Zytokinklasse zu der unter anderem IL-6, IL-12 und IL-15 gehören. Der Leptin-Rezeptor (OB-R) wird der Zytokin-Rezeptor-Familie Klasse I zugeordnet. Die Sequenz des

Rezeptors zeigt dabei eine starke Homologie mit den Rezeptoren des „granulocyte colony-stimulating factor“, des „leukemia inhibitory factor“, dem Onkostatin M sowie der gp130-Familie auf (127). Der OB-R kommt in mehreren Splice-Varianten vor, von denen bisher sechs verschiedene identifiziert wurden, die sich in der Länge ihrer zytoplasmatischen Domänen unterscheiden und OB-Ra-f benannt wurden (129).

Leptin-Rezeptor

Die verschiedenen OB-R-Isoformen werden in unterschiedlicher Quantität exprimiert. Die am weitesten verbreitete Form, der OB-Ra, findet sich unter anderem auf Lunge, Leber, Milz, Niere und Makrophagen. Wie auch die Isoformen OB-Rc, OB-Rd und OB-Rf scheint der OB-Ra bei der Leptin-vermittelten Signaltransduktion keine Rolle zu spielen (130). Die genaue Funktion dieser Isoformen ist noch nicht geklärt. Auf Grund der hohen Expressionsdichte von OB-Ra und OB-Rc im Plexus choroideus und den Kapillaren im zentralen Nervensystem, wird jedoch eine Rolle beim Leptin-Transport durch die Blut-Hirn-Schranke angenommen (131). Der OB-Re stellt einen löslichen Rezeptor dar, der eine Carrierfunktion einnimmt, wobei im Plasma an diesen Rezeptor gebundenes Leptin länger in der Zirkulation verbleibt (129, 132, 133). Der OB-Rb ist mit 1162 Aminosäuren die längste Splice-Variante des OB-R. Gleichzeitig ist er die einzige Isoform, für die eine durch Leptin-Bindung ausgelöste Signaltransduktion nachgewiesen werden konnte. Er wird unter anderem in Bereichen des Hypothalamus, welche mit der Regulation von Appetit und Körpergewicht in Verbindung stehen, aber auch auf Endothelzellen, Epithelzellen, β-Zellen des Pankreas, den Ovarien, auf $CD34^+$ hämatopoetischen Knochenmarks-Vorläuferzellen, Adipozyten, Monozyten / Makrophagen, Epithelzellen sowie T- und B-Zellen exprimiert (129, 134).

Signaltransduktion

Der OB-R liegt als Homodimer vor. Jeder Rezeptor kann ein Leptin-Molekül binden, wodurch ein Tetramer-Komplex aus je zwei Rezeptoren und Liganden entsteht (135, 136). Die Bindung von Leptin an den Ob-Rb führt zur Aktivierung der an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors assoziierten Kinase JAK2 („Janus-family tyrosine kinase-2“), was die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domänen des Ob-Rb auslöst. Letztere sind infolgedessen für Signal-übertragende Moleküle der STAT-Familie zugänglich. STAT-Proteine können nach Aktivierung in den Nukleus translokalisieren und dort die

Transkription verschiedener Zielgene induzieren, welche die Wirkung von Leptin vermitteln (137, 138).

Leptin-Wirkung auf verschiedene Zellpopulationen des Immunsystems

Eine Reihe von Studien haben sich mit der Wirkung von Leptin auf unterschiedliche Zellen des Immunsystems beschäftigt. Mittlerweile ist eindeutig belegt, dass Leptin sowohl Zellen des adaptiven Immunsystems als auch Komponenten des angeborenen Immunsystems wie Neutrophile und Makrophagen beeinflussen kann. Auf die einzelnen Zellpopulationen wird im Folgenden eingegangen (Abbildung 4):

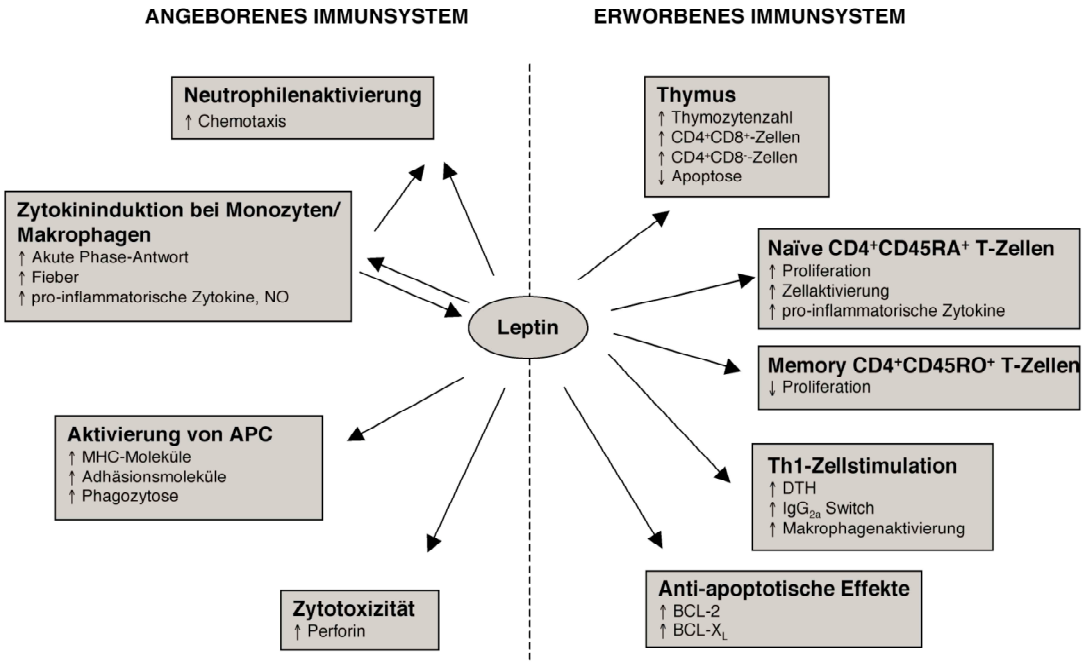

Abbildung 4. Einfluss von Leptin auf das angeborene und erworbene Immunsystem. (DTH, delayed type hypersensitivity; APC, Antigen-präsentierende Zelle; Abbildung modifiziert nach (130)).

Die Stimulation von **T-Zellen** mit Leptin *in vitro* kann sowohl bei $CD4^+$- als auch bei $CD8^+$-Zellen zu einer Aktivierung führen. Die Aktivierung spiegelt sich in einer Hochregulation von Aktivierungsmarkern (CD69, CD71), in der vermehrten Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine sowie einer Erhöhung der Expression von Adhäsionsmolekülen wider (139). Die Wirkung von Leptin zumindest auf $CD4^+$ T-Zellen steht dabei in Abhängigkeit vom vorherigen Aktivierungszustand der Zellen: Während Leptin auf **naïve** ($CD45RA^+$) humane $CD4^+$ T-Zellen bei gleichzeitiger Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern proliferationsfördernd wirkt und die Produktion von IL-2 und IFNγ induziert, ist die Wirkung auf **memory** T-Zellen ($CD45RO^+$) konträr: Die anti-CD3-

induzierte Proliferation aber auch Zytokinproduktion wird durch parallele Leptin-Gabe bei dieser Zellpopulation gehemmt (139, 140).

Auch auf Zellen des angeborenen Immunsystems wirkt Leptin aktivierend und unterstützt somit entzündliche Vorgänge. So konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass Leptin bei **Monozyten / Makrophagen** deren Phagozytoseleistung sowie die Freisetzung von Leukotrien B4, NO, pro-inflammatorischen Zytokinen und Cyclooxygenase-2 steigert (130, 141, 142). Ob die Zytokin-Induktion einen direkten Effekt von Leptin auf die Monozyten/Makrophagen darstellt, oder ob es sich hierbei nur um einen indirekten Effekt handelt, ist nicht geklärt.

Bei *ob/ob*-Mäusen lässt sich nicht nur eine Verminderung der T-Zellzahl, sondern auch eine erniedrigte Zahl von **NK-Zellen** beobachten. Darüber hinaus können NK-Zellen direkt durch Leptin aktiviert werden (143, 144).

1.4.3 Leptin-/Leptin-Rezeptor-Defizienz in der Maus

Als Hauptfunktion von Leptin wurde die appetithemmende Wirkung definiert. Jedoch sind sowohl *ob/ob*- als auch *db/db*-Tiere nicht nur adipös. Diese Tiere weisen ein komplexes Syndrom charakterisiert durch Sterilität, hormonelle Dysregulation sowie Veränderungen des hämatopoetischen Systems und des Immunsystems auf. Vergleichbare Veränderungen wurden in Leptin-defizienten Menschen beobachtet und sind im nächsten Abschnitt beschrieben (145). *In vivo*-Untersuchungen der letzten Jahre konnten eine Resistenz der *ob/ob*- und *db/db*-Tiere in einer Vielzahl von Entzündungsmodellen zeigen. Auf diese wird in der *Diskussion* unter Einbeziehung der eigenen Ergebnisse eingegangen.

1.4.4 Leptin-/Leptin-Rezeptor-Defizienz im Menschen

Entgegen der anfänglichen Hoffnung ist die Adipositas beim Menschen meist nicht auf eine Leptin-Defizienz zurückzuführen. Es wird geschätzt, dass sich bei etwa 1 von 250 adipösen Menschen eine entsprechende Mutation nachweisen lässt (146). Auf die einzelnen in der Literatur beschriebenen Fälle von Leptin- bzw. OB-R-Defizienz wird im Folgenden eingegangen. Bereits 1996 wurde bei zwei Kindern mit einer schweren Adipositas eine Mutation im Leptin-Gen und damit eine kongenitale Leptin-Defizienz nachgewiesen (147). Beide Kinder zeigten keine zusätzlichen Merkmale, die auf ein

Prader-Willi- oder Alström-Syndrom, also andere Syndrome, die mit einer Adipositas assoziiert sind, hingedeutet hätten. Im Gegensatz zu den *ob/ob*-Mäusen, war bei diesen Kindern kein Hyperkortisolismus nachweisbar. Die Insulin-Serumkonzentrationen waren erhöht und die Wachstumskurve war nicht beeinträchtigt (147). Ähnliche Veränderungen wurden für drei Mitglieder einer türkischen Familie beschrieben, für die ebenfalls eine Mutation im Leptin-Gen nachgewiesen werden konnte, sowie heterozygote Veränderungen bei anderen Familienmitgliedern. Hier konnten die oben beschriebenen Befunde für die Leptin-defizienten Kinder erstmals bei Erwachsenen bestätigt werden (148). In einer Folgearbeit wurde diese türkische Familie genauer charakterisiert, in der Familie konnten elf Mitglieder mit einer Leptin-Defizienz nachgewiesen werden. Hiervon starben sieben in früher Kindheit an Infektionen. Vier Patienten leben noch und zeigen ebenfalls die oben beschriebenen Veränderungen, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind (145).

Arbeiten aus den letzten zwei Jahren zeigen erste Ergebnisse zu Leptin-Mangel bzw. -Defizienz und den damit assoziierten Veränderungen des Immunsystems im Menschen. In der Arbeit von Palacio und Mitarbeitern wurden fünfzehn unterernährte Kinder mit niedrigen Leptin-Serumkonzentrationen, mit normalgewichtigen Kontrollen verglichen. Die Gruppe der unterernährten Kinder wies eine signifikant verminderte T-Zellproliferation, sowie eine verminderte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine auf (149). Nach einer 10%igen Gewichtszunahme sowie einem damit assoziierten Anstieg der Leptin-Serumkonzentrationen, waren keine Unterschiede bzgl. der genannten Parameter mehr nachweisbar. Eine zweite Studie führte vergleichbare Untersuchungen an Leptin-defizienten Kindern durch. Bei drei Kindern mit einer morbiden Adipositas bei kongenitaler Leptin-Defizienz zeigte sich eine verminderte Zahl an zirkulierenden $CD4^+$ T-Zellen, eine verminderte T-Zell-Proliferation sowie Zytokin-Freisetzung. Nach einer subkutanen Leptin-Substitution über einen Zeitraum von maximal vier Jahren normalisierten sich das Körpergewicht, die Hormondysregulation sowie die genannten immunologischen Veränderungen (146).

Tabelle 1. Charakteristika Leptin-defizienter Menschen (145, 147-150)**.**

Endokrinologie	**Immunologie**
• Adipositas, Hyperphagie • Hypogonadismus • Sterilität • im Gegensatz zur *ob/ob*-Maus kein Hyperkortisolismus	• erhöhte Empfindlichkeit gegenüber opportunistischen Infektionen • verminderte T-Zellproliferation • verminderte Zahl naïver $CD4^{+}CD45RA$-T-Zellen • gestörte Zytokinsynthese: vermehrte TGFβ-Produktion, verminderte IFNγ-, IL-4-, IL-10-Produktion

1.4.5 Zielsetzung und Fragestellung Teil 2

Für Leptin-defiziente Tiere konnte eine Protektion in verschiedenen Entzündungsmodellen wie der Kollagen-induzierten Arthritis sowie der Autoimmunenzephalomyelitis bereits gezeigt werden. Eine genaue Charakterisierung der Rolle von Leptin im intestinalen Entzündungsprozess mit Hinblick auf die Effektorzellpopulation sowie Leptinproduzenten fehlt jedoch bislang.

Um dies und damit ein grundsätzliches Verständnis von Leptin in der intestinalen Entzündung zu ermöglichen, werden Leptin-defiziente Mäuse zunächst in den Modellen der DSS- und der TNBS-induzierten Kolitis untersucht. Aufgrund des adipösen Phänotyps soll zunächst im Modell der Concanavalin A-induzierten Hepatitis, aber auch der DSS-induzierten Kolitis evaluiert werden, in wieweit die Leptin-Defizienz und nicht der adipöse Phänotyp für die beobachteten Veränderungen verantwortlich ist.

Die bisherigen *in vitro*-Ergebnisse aus der Literatur deuten auf einen stimulatorischen Effekt von Leptin auf naïve T-Zellen hin. Unter Verwendung von T-Zell-abhängigen Modellen sowie des Kolitis-Transfermodells soll der direkte pro-inflammatorische Effekt von Leptin auf T-Zellen, als mögliche Effektorzellpopulation in der Lamina propria, untersucht werden.

Die Protektion von Leptin-defizienten Tieren in induzierbaren Entzündungsmodellen wurde gezeigt, jedoch bleibt die Rolle der Leptin-Defizienz in der spontanen Entzündung unklar. Dies soll am Beispiel der spontanen Kolitis der IL-10 KO-Maus geklärt werden, hierzu werden IL-10- Leptin-Doppel-KO-Tiere generiert und vergleichend mit IL-10 KO-Tieren charakterisiert.

Diese Untersuchungen ermöglichen zum einen eine Einordnung von Leptin in das Mediatornetzwerk der intestinalen Entzündung und stellen zum anderen eine Basis für das Verständnis der Interaktionen von Endokrinologie und Immunologie dar.

2 Eigene Arbeiten

Im Folgenden sind die Arbeiten beider Bereiche entsprechend der beigefügten Arbeiten zusammengefasst.

2.1 Die Funktion von Interleukin-18 in der intestinalen Entzündung und therapeutische Strategien

2.1.1 Die Interleukin-18-Neutralisation mildert die experimentelle Kolitis

(**Siegmund B.**, Fantuzzi G., Rieder F., Gamboni-Robertson F., Lehr H. A., Hartmann G., Dinarello C. A., Endres S. und Eigler A. Neutralization of IL-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFNγ and TNFα production. *American Journal of Physiology* (2001) 281:R1264-73)

In der entzündeten Mukosa von Patienten mit Morbus Crohn konnten erhöhte Konzentrationen von IL-18 nachgewiesen werden. Um eine Funktion von IL-18 als pro-inflammatorisches Zytokin im intestinalen Entzündungsprozess beweisen zu können, wurde in dem Modell der experimentellen DSS-induzierten Kolitis der Effekt von IL-18-neutralisierendem Antiserum untersucht. Diese Untersuchungen wurden in Balb/c- und C57BL/6-WT-Tieren durchgeführt. Mit zunehmender DSS-Konzentration im Trinkwasser und damit assoziierten Zunahme der intestinalen Entzündung wurde ein paralleler Anstieg der IL-18-Konzentration im Gewebe nachgewiesen, wobei die IL-18-Synthese insbesondere in Epithelzellen gezeigt werden konnte. Durch Neutralisation von IL-18 wurde eine signifikante Reduktion der intestinalen Entzündung erzielt, was sich zum einen durch eine reduzierte Gewichtsabnahme sowie eine im Vergleich zu den nicht-behandelten DSS-exponierten Tieren kaum erfolgte Kolonverkürzung, ein Zeichen der Entzündung in diesem Modell, manifestierte. Sowohl in Kolon-Gewebehomogenisaten, als auch im Überstand der Kolonorgankultur zeigte sich eine signifikante Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNFα, IFNγ und IL-18. Abschließend konnte der für andere Zellpopulationen vorbeschriebene synergistische Effekt von IL-12 und IL-18 in Bezug auf die IFNγ-Induktion in LPMC bestätigt werden. Diese Arbeit zeigte somit erstmals eine funktionelle pro-inflammatorische Rolle für IL-18 in der experimentellen Kolitis auf.

2.1.2 Die Rolle des "interleukin-1β converting enzyme" in der intestinalen Entzündung

(**Siegmund B.**, Lehr H. A., Fantuzzi G. und Dinarello C. A. Interleukin-1β-converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* (2001) 98:13249-54)

Das „interleukin-1β converting enzyme" (ICE) stellt eine intrazelluläre Protease dar, welche die inaktiven Vorläufer-Proteine von IL-1β und IL-18 in die aktiven Proteine spaltet. In der vorliegenden Studie wurde der Effekt von *ICE*-Defizienz auf die intestinale Entzündung untersucht. In dem Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis zeigten *ICE*-KO-Tiere einen signifikant verminderten Gewichtsverlust, Diarrhö, rektale Blutung und Verkürzung der Kolonlänge als indirekte Parameter der Entzündung. Im Gegensatz dazu zeigten DSS-exponierte Tiere, die mit einem IL-1-Rezeptor-Antagonisten behandelt wurden nur eine geringe Milderung der intestinalen Entzündung verglichen mit den DSS-exponierten WT-Tieren. Um weiter den Effekt der *ICE*-Defizienz in einer chronischen Kolitis zu untersuchen, wurde ebenfalls mittels DSS eine chronische Kolitis in WT bzw. *ICE* KO-Tieren induziert. In diesem Modell zeigten die *ICE* KO-Tiere eine beinahe komplette Protektion, die am Deutlichsten in den histologischen Schnitten zu erkennen war. Dieser Schutz war assoziiert mit einer signifikanten Reduktion der spontanen Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-18, IL-1β und IFNγ. Mittels Durchflusszytometrie konnte eine verminderte Zellaktivierung in den Lymphozyten der drainierenden mesenterialen Lymphknoten der *ICE* KO-Tiere nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Inhibition des ICE eine neue anti-inflammatorische Strategie für die intestinale Entzündung darstellt.

2.1.3 Die pharmakologische Inhibition von ICE schützt vor experimenteller Kolitis

(Loher F., Bauer C., Landauer N., Schmall K., **Siegmund B.**, Lehr H.A., Dauer M., Schoenharting M., Endres S. und Eigler A. The ICE inhibitor pralnacasan reduces dextran sulfate sodium-induced murine colitis and Th1 T-cell activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (2004), 308:583-90)

Für IL-18 konnte eine kritische pro-inflammatorische Rolle in der intestinalen Entzündung gezeigt werden. Sowohl IL-18 als auch IL-1β werden als inaktive Vorläufer-Proteine gebildet und müssen durch die Protease ICE zu den aktiven Proteinen gespalten werden. ICE kann durch den spezifischen pharmakologischen Inhibitor Pralnacasan gehemmt werden. In der vorliegenden Studie wurde der Effekt der pharmakologischen ICE-Inhibition durch Pralnacasan im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis untersucht. Pralnacasan wurde hierzu täglich intraperitoneal gespritzt oder oral appliziert, beginnend an dem ersten Tag der DSS-Exposition. Die Behandlung mit Pralnacasan führte zu einer signifikanten Reduktion des klinische Scores (Gewicht, Diarrhö, rektale Blutung). Es konnte weiter die lokale IL-18-Synthese im Kolongewebe signifikant reduziert werden sowie die IFNγ-Synthese der drainierenden mesenterialen Lymphknoten. In den Pralnacasan-behandelten Tieren wurden keine Nebenwirkungen beobachtet. Die Inhibition von ICE durch Pralnacasan stellt damit eine effektive Therapie im Modell der DSS-induzierten Kolitis dar.

2.2 Charakterisierung der Funktion von Leptin im mukosalen Immunsystem

2.2.1 Leptin-Defizienz, nicht die Adipositas, schützt Mäuse vor der Concanavalin A-induzierten Hepatitis

(**Siegmund B.**, Lear-Kaul K. C., Faggioni R. und Fantuzzi G. Leptin deficiency, not obesity, protects mice from Con A-induced hepatitis. *European Journal of Immunology* (2002) 32:552-60)

Leptin-defiziente *ob/ob*-Mäuse sind im Modell der Con A-induzierten Hepatitis geschützt. Es war bislang jedoch unklar, ob dieser Schutz auf die Leptin-Defizienz oder die damit assoziierte Adipositas zurückzuführen ist. Um diese Frage beantworten zu können, wurden adipöse WT-Mäuse mit hohen Leptin-Serumkonzentrationen durch Injektion von Goldthioglukose (GTG) generiert (WT GTG). Sowohl WT- als WT GTG-Tiere entwickelten nach Con A-Injektion eine Hepatitis, wohingegen bei den *ob/ob*-Tieren keine Hepatitis nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus war in den mononukleären Zellen der Leber (LMNC) von WT- und WT GTG-Tieren nach Con A-Injektion die Konzentrationen von TNFα und IFNγ sowie die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 signifikant erhöht, nicht jedoch in *ob/ob*-Tieren. Die Leber von WT- und WT GTG-Tieren zeigte den gleichen Anteil an NK T-Zellen, eine Lymphozyten-Population, die in diesem Modell eine entscheidende Rolle einnimmt. Diese Population nahm nach Con A-Injektion in WT- und WT GTG-Tieren ab. Im Gegensatz dazu, zeigte die Leber der *ob/ob*-Tiere etwa 50% weniger NK T-Zellen, diese Zellpopulation änderte sich in den *ob/ob*-Tieren nach Con A-Injektion nicht. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die durch die Leptin-Defizienz vermittelten Veränderungen des Immunsystems, nicht aber die Adipositas, vor der Con A-induzierten Hepatitis schützt.

2.2.2 Leptin: Ein entscheidender Mediator in der intestinalen Entzündung

(**Siegmund B.**, Lehr H. A. und Fantuzzi G. Leptin: a pivotal role in intestinal inflammation. *Gastroenterology* (2002) 122:2011-2025)

Neben der appetithemmenden Wirkung weist Leptin eine modulierende Funktion im Immunsystem auf. Ziel dieser Untersuchungen war es, die Rolle von Leptin in der intestinalen Entzündung erstmals zu charakterisieren. Hierzu wurden im Modell der akuten und chronische DSS-induzierten Kolitis sowie im Modell der TNBS-induzierten Kolitis WT- und Leptin-defiziente *ob/ob*-Tiere verglichen. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass die Leptin-Stimulation sowohl von intraepithelialen Lymphozyten als auch von LPMC in einer Aktivierung des Ob-Rb-abhängigen Signaltransduktionsweges STAT-3 resultiert. Im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis konnte in den *ob/ob*-Tieren eine 72%ige-Reduktion des Kolitis-Schweregrads sowie der spontanen Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine in der Kolonorgankultur nachgewiesen werden. Wurde den Leptin-defizienten *ob/ob*-Tieren Leptin substituiert, so wurde dieser protektive Effekt komplett aufgehoben. Folglich ist nicht die Adipositas, sondern die Leptin-Defizienz für die Protektion in diesem Modell verantwortlich. In den Modellen der chronischen DSS-Kolitis sowie der TNBS-induzierten Kolitis waren *ob/ob*-Tiere ebenfalls geschützt. Dieser Schutz, der sich in dem makroskopischen Score (Gewicht, Diarrhö, rektale Blutung) sowie in der Histologie zeigte, war mit einer verminderten IFNγ-Synthese der intraepithelialen Lymphozyten assoziiert. Zusätzlich konnte in den LPMC der *ob/ob*-Tiere eine deutlich erhöhte Apoptoserate verglichen mit LPMC der WT-Tieren nachgewiesen werden. Im Kolonhomogenisat von WT-, nicht aber von Leptin-defizienten *ob/ob*-Tieren, war eine STAT-3-Aktivierung sowie eine Induktion der Cyclooxygenase-2 nachweisbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass Leptin eine wichtige Verbindung zwischen dem endokrinen System und dem Immunsystem darstellt sowie einen wichtige pro-inflammatorischen Mediator in der intestinalen Entzündung.

2.2.3 Der Leptin-Rezeptor auf T-Zellen moduliert die chronisch intestinale Entzündung

(**Siegmund B.**, Senello J. A., Jones-Carson J., Gamboni-Robertson F., Lehr H. A., Batra A., Fedke I., Zeitz M. und Fantuzzi G. Leptin receptor on T lymphocytes modulates chronic intestinal inflammation in mice. *Gut* (2004), 53:965-72)

Die Vorarbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Leptin regulierend in das Immunsystem eingreift, es war bislang jedoch unklar, ob dies auf einen stimulierenden Effekt von Leptin auf T-Zellen zurückzuführen ist. Mit der vorliegenden Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob die Expression der langen Isoform des Leptin-Rezeptors (OB-Rb) auf T-Zellen die intestinale Entzündung beeinflussen kann. Hierzu wurde das Modell der Transferkolitis eingesetzt, bei dem durch den Transfer von naïven $CD4^+CD45Rb^{high}$-Zellen in *scid*-Mäuse eine Kolitis induziert wird. Es wurden $CD4^+CD45Rb^{high}$-Zellen von WT oder OB-Rb-defizienten *db/db*-Tieren in *scid*-Mäuse transferiert und die Kolitis-Entwicklung beurteilt. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass sowohl auf $CD4^+CD45Rb^{high}$-Zellen als auch auf $CD4^+CD45Rb^{low}$-Zellen der OB-Rb exprimiert wird. Nach dem Transfer von $CD4^+CD45Rb^{high}$-Zellen aus WT-Tieren konnte in den Lymphozyten der entzündeten Areale im Kolon eine erhöhte Leptin-Produktion nachgewiesen werden. Durch den Transfer von $CD4^+CD45Rb^{high}$-Zellen aus *db/db*-Tieren kam es im Vergleich zu dem Transfer von WT-Zellen nur sehr verzögert zu einer Kolitis-Entwicklung. In den ersten vier Wochen konnte eine hohe Apoptoserate in den LPMC der Tiere, die die $CD4^+CD45Rb^{high}$-Zellen aus *db/db*-Tieren erhielten, gezeigt werden. Ein hoher Glukokortikoid-Serumspiegel in den *db/db*-Spendertieren konnte als Erklärung für die beobachtete Protektion ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu Rezipienten von WT-Zellen war die Expression von „peroxisome proliferator activated receptor γ“ (PPARγ) im Kolon von Rezipienten von *db/db*-Zellen signifikant erhöht. Frisch isolierte *db/db* $CD4^+CD45Rb^{high}$-Zellen produzierten signifikant weniger IFNγ. Nach acht Wochen zeigten die Rezipienten von WT- und *db/db*-Zellen keinen Unterschied mehr bezüglich des Schweregrades der intestinalen Entzündung. Diese Untersuchungen zeigen, dass die Effekte von Leptin in der Peripherie auf das Immunsystem direkt über den OB-Rb auf T-Zellen vermittelt werden.

2.2.4 Entwicklung einer intestinalen Entzündung in Interleukin-10-/Leptin-Doppelknockout-Mäusen

(**Siegmund B.**, Sennello J. A., Lehr H. A., Batra A., Fedke I., Zeitz M. und Fantuzzi G. Development of intestinal inflammation in double IL-10 and leptin-deficient mice. *Journal of Leukocyte Biology* (2004), 76:782-6)

Leptin-defiziente *ob/ob*-Mäuse sind in verschiedenen Entzündungsmodellen geschützt. Um zu beurteilen, ob die Leptin-Defizienz die spontane intestinale Entzündung in IL-10 KO-Tieren beeinflussen kann, wurden IL-10- Leptin-defiziente Doppel-KO (IL-10 KO *ob/ob*)-Mäuse generiert und mit IL-10 KO-Tieren in Bezug auf den Verlauf der intestinalen Entzündung verglichen. Die IL-10 KO *ob/ob*-Tiere verloren signifikant an Gewicht verglichen mit den *ob/ob*-Tieren, waren aber im Vergleich zu den WT- oder IL-10 KO-Tieren immer noch adipös. Sowohl die makroskopische als auch die histologische Entwicklung der Kolitis war in IL-10 KO- und IL-10 KO *ob/ob*-Tieren vergleichbar. In Übereinstimmung damit wurde kein Unterschied in der Produktion von IFNγ, IL-6 und IL-13 in den Überständen der Kolonkultur gemessen. Einzig die Apoptoserate der LPMC war bei den IL-10 KO *ob/ob*-Tieren signifikant höher als bei den IL-10 KO-Tieren. Zusammenfassend kann hieraus geschlossen werden, dass die Leptin-Defizienz die spontane Entzündung der IL-10 KO-Tiere nicht beeinflussen kann.

3 Diskussion

Das Verständnis der Interaktion der unterschiedlichen Mediatoren im Netzwerk der intestinalen Entzündung ist essentiell für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien. Mit den vorgelegten Arbeiten kann die Position von IL-18 und Leptin in diesem Netzwerk definiert werden. Im Folgenden wird dies unter Einbeziehung der eigenen Daten und der Literatur zunächst getrennt für beide Mediatoren durchgeführt. Abschließend erfolgt eine gemeinsame Einordnung von Leptin und IL-18 in das Mediatornetzwerk der intestinalen Entzündung.

3.1 Interleukin-18 als pro-inflammatorischer Mediator in der intestinalen Entzündung

3.1.1 Interleukin-18-Neutralisation in der experimentellen Kolitis

Durch die initialen Untersuchungen von vier Arbeitsgruppen konnte sowohl die Relevanz als auch die zelluläre Quelle von IL-18 in der intestinalen Entzündung definiert werden. Diese vier Arbeiten und somit die Einordnung von IL-18 in das pro-inflammatorische Netzwerk sind in Tabelle 2 zusammengefasst und werden im Folgenden näher erläutert.

Unsere eigene Gruppe untersuchte als erste die Blockade von IL-18 in der experimentellen intestinalen Entzündung (siehe auch *2.1.1*, (151)). Diese resultierte in einer klinischen und histologischen Reduktion der intestinalen Entzündung, assoziiert mit einer verminderten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (151). Diese Arbeit deutete bereits auf eine entscheidende pro-inflammatorische Mediatorfunktion in diesem Modell hin, weiter konnte das Kolonepithel als Hauptsyntheseort von IL-18 identifiziert werden.

Kanai und Kollegen verwendeten das Modell der TNBS-induzierten Kolitis. Makrophagen stellten in diesem Modell den Hauptproduzenten von IL-18 dar (89). Sowohl in IL-18 KO-Tieren als auch in Mäusen, die mit einem IL-18-neutralisierenden Antikörper behandelt wurden, konnte mit TNBS keine signifikante Kolitis induziert werden. Damit übereinstimmend führte eine Depletion der Makrophagen zu einer Protektion im Modell der TNBS-induzierten Kolitis (89).

Tabelle 2. Anti-Interleukin-18-Strategien in der experimenteller Kolitis.

Kolitismodell	**anti-IL-18 Strategie**	**Ergebnisse**	**Referenzen**
Dextran-Sodium-Sulfat	anti-IL-18 Antiserum	• IL-18 wird vorwiegend in intestinalen Epithelzellen exprimiert • eine Zunahme der intestinalen Entzündung ist mit einer zunehmenden IL-18-Expression assoziiert • durch die Neutralisation von IL-18 können die histologischen Entzündungszeichen signifikant gesenkt werden • nach IL-18-Neutralisation sind die Konzentrationen von IFNγ, IL-18 und TNFα im Kolon signifikant erniedrigt	(151)
Trinitrobenzen-Sulfonsäure (TNBS)	anti-IL-18 Ak*	• IL-18 wird vorwiegend in intestinalen Makrophagen exprimiert • die Behandlung mit dem anti-Mac1-Saporin-Ak (Makrophagen-depletierender Ak) bzw. mit dem neutralisierenden Ak gegen IL-18 resultiert in einer signifikanten Reduktion der histologischen Entzündung sowie der IFNγ-Produktion • in IL-18 KO-Tieren kann mit TNBS keine signifikante Kolitis induziert werden	(89)
TNBS	IL-18BPa*	• die Behandlung mit IL-18BPa resultierte in einer deutlichen Reduktion der histologischen Entzündung • weiter wurde in den mit IL-18BPa behandelten Tieren eine signifikante Reduktion von TNFα, IL-1β und IL-6 gezeigt, wohingegen keine Reduktion von IFNγ, IL-10 und IL-4 gemessen werden konnte	(90)
$CD62L^+$ $CD4^+$ Transfer-Modell	lokale Gabe ein IL-18-Antisense mRNA exprimierenden Adenovirus	• die IL-18-Expression ist begrenzt auf die intestinalen Epithelzellen, sowie mononukläre Zellen der Lamina propria • nach Behandlung zeigte sich eine signifikante Abnahme der histologischen und endoskopischen Entzündung • durch die Antisense-Strategie war die IL-18-Synthese in der Lamina propria gehemmt	(152)

*IL-18BPa = IL-18 Binding Protein Isoform a; Ak = Antikörper; TNBS = Trinitrobenzen-Sulfonsäure

Ten Hove und Kollegen verwendeten ebenfalls das Modell der TNBS-induzierten Kolitis. Zur IL-18-Neutralisation wurde jedoch der natürliche Antagonist das IL-18 „binding protein“ (IL-18BP) verwendet (90). Das humane *IL-18BP*-Gen kodiert für vier verschiedene Isoformen (a-d), die durch alternatives mRNA-Splicing generiert werden (153). Diese Isoformen unterscheiden sich durch ihre Bindungsaffinität zu IL-18, ausschließlich die Isoformen a und c können IL-18 neutralisierend binden. In der vorliegenden Studie wurde die Isoform a des IL-18BP appliziert. Durch die Neutralisation von IL-18 konnte so eine verminderte makroskopische Entzündung assoziiert mit einer verminderten Konzentration von TNFα, IL-6 und IL-1β im Kolonhomogenisat nachgewiesen werden (90).

In der zuletzt publizierten Arbeit von diesen initialen Publikationen konnten Wirtz und Kollegen einen schützenden Effekt der IL-18-Neutralisation in dem Transfermodell nachweisen (152). Die Neutralisation erfolgte durch die lokale Applikation eines Adenovirus, der eine IL-18-Antisense mRNA exprimiert. Bei diesem Modell werden naïve $CD4^+CD62L^+$ T-Zellen in *scid*-Mäuse transferiert. Dieses Modell entspricht dem $CD4^+CD45Rb^{high}$-Transfer-Modell, welches einleitend unter *1.2.4* detailliert beschrieben wurde (154). In dieser Studie konnte sowohl die IL-18-Konzentration im Kolon als auch die histologischen und endoskopischen Entzündungszeichen durch die Adenovirus-Behandlung signifikant reduziert werden (152).

3.1.2 Das „interleukin-1β converting enzyme“ als anti-inflammatorischer Angriffspunkt in der intestinalen Entzündung

Die Inhibition von IL-18 durch die selektive Blockade von ICE, wie am Beispiel der ICE KO-Tiere bzw. durch die pharmakologische Inhibition in unseren Arbeiten gezeigt, stellt aus mehreren Gründen ein attraktives Konzept dar. Wie eingangs geschildert, kann bei Inhibition von ICE selektiv die Aktivierung von IL-18 und IL-1β gehemmt werden, wobei unsere Arbeiten zeigen, dass in Bezug auf die intestinale Entzündung die Inhibition der Aktivierung von IL-18 entscheidend ist, da die selektive Neutralisation von IL-1 durch den IL-1-Rezeptorantagonisten den Verlauf der Kolitis nicht entscheidend beeinflusst. Insbesondere im Modell der chronischen DSS-Kolitis konnte in den *ICE KO*-Tieren keine Entzündung nachgewiesen werden (155).

Diese Befunde werden durch klinisch-experimentelle Daten aus der Gruppe von McAlindon gestützt (115). So führt die Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) von intestinalen Makrophagen, die aus nicht-entzündetem Kolongewebe isoliert wurden, zu einer Produktion des biologisch inaktiven pro-IL-1β, es kam jedoch nicht zu einer Aktivierung von ICE (115). Wurden jedoch intestinale Makrophagen von Patienten mit Morbus Crohn verwendet, so konnte durch LPS-Stimulation *ICE* aktiviert werden, und es wurde in der Folge aktives IL-1β sezerniert (115).

Es stehen mehrere ICE-Inhibitoren für *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen zur Verfügung. Pralnacasan stellt einen oral applizierbaren ICE-Inhibitor dar, der bereits in Phase I und II klinischen Studien untersucht wurde. Diese zeigen, dass Pralnacasan gut absorbiert wird und effektive Plasmakonzentrationen erreicht. Die bisherigen Untersuchungen an Gesunden sowie Patienten mit rheumatoider Arthritis weisen ein günstiges Nebenwirkungsprofil auf (156, 157). Unsere eigenen Daten aus der experimentellen Kolitis (siehe auch *2.1.3*) zeigen, dass die Pralnacasan-Behandlung in der DSS- und TNBS-induzierten Kolitis zu einer signifikanten Reduktion der Entzündung führt (158, 159). Damit stellt die Suppression von IL-18 durch die orale Applikation von ICE einen eleganten pharmakologischen Ansatzpunkt dar.

3.1.3 Einordnung von Interleukin-18 in die Effektoranwtort

Unter Zusammenfassung der eigenen Daten sowie der Ergebnisse der Literatur kann die Position von IL-18 im Netzwerk der intestinalen Entzündung definiert werden, schematisch ist dies in Abbildung 5 dargestellt. IL-18 wird während einer Entzündung sowohl von dem Kolonepithel als auch von Antigen-präsentierenden Zellen vermehrt exprimiert. Dies führt zusammen mit IL-12 zu einer synergistischen Aktivierung von T-Zellen und nachfolgend zu einer Hochregulation pro-inflammatorischer Zytokine sowie zu einer Apoptosesuppression. Durch entsprechende Neutralisation kann die Ausprägung der experimentellen Kolitis signifikant reduziert werden.

Den experimentellen Daten zu Folge sind verschiedenste Strategien zur Suppression von IL-18 denkbar, beginnend mit neutralisierenden Antikörpern und der Antisense-Technologie, über ICE-Inhibitoren bis hin zu dem physiologischen Antagonisten dem IL-18BP.

Damit stellt IL-18 zum einen einen kritischen Mediator in der intestinalen Entzündung dar, zum anderen bietet es einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt in der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.

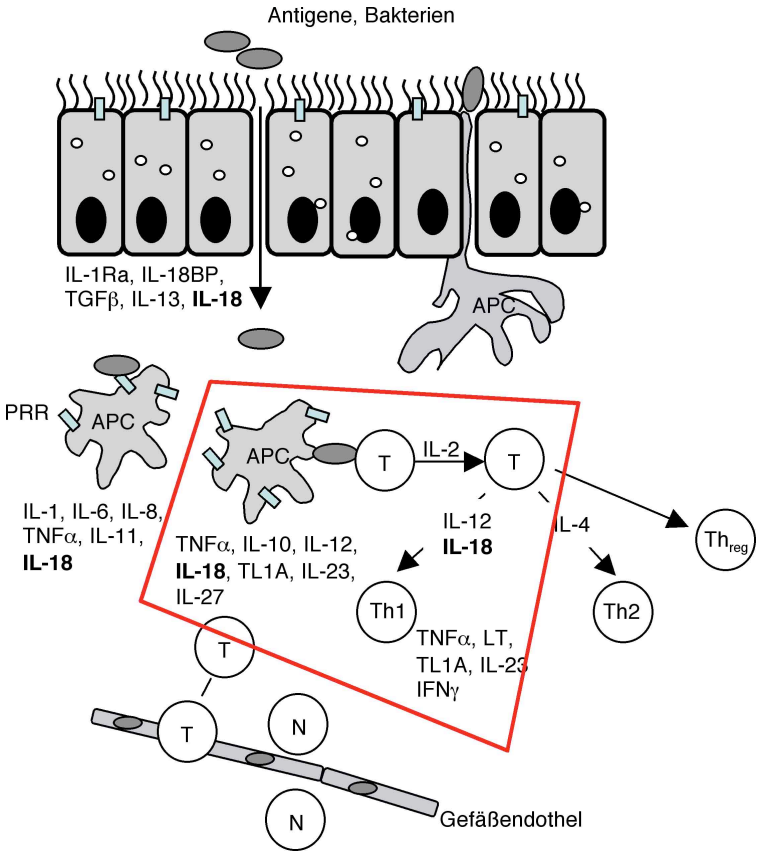

Abbildung 5. IL-18 als Mediator in der Effektorantwort. (APC = Antigen prässentierende Zellen; T = T-Zellen; N = neutrophile Granulozyten; PRR = „pattern recognition receptor“).

3.2 Leptin als Mediator in der intestinalen Entzündung

Um unter Einbeziehung der Daten aus der Literatur sowie der eigenen Daten Leptin in das Netzwerk der Mediatoren in der Entzündungsantwort einordnen zu können, sollen zunächst die bisher publizierten *in vivo*-Daten zusammengefasst werden (siehe hierzu auch Tabelle 3).

Erste Hinweise, dass Leptin auch im Tiermodell viel mehr als einen Regulator von Nahrungsaufnahme und Stoffwechsel darstellt, zeigte sich in frühen Beobachtungen, dass adipöse OB-Rb-defiziente *db/db*-Tiere bei Hautallograft-Transplantationen eine verminderte Abstoßungsreaktion und geringere T-Zellaktivierung in der Milz verglichen mit WT-Tieren aufwiesen (160). Bei der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) vermittelt die Leptin-Defizienz ebenfalls einen protektiven Effekt. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass in diesem Modell aktivierte T-Lymphozyten in den entzündeten Arealen im Gehirn selber Leptin produzieren (161-163). Ähnliche Resultate hinsichtlich verminderter Sensibilität gegenüber induzierten Entzündungsreaktionen bei Leptin-Mangel lieferten auch Untersuchungen in den Modellen zur Immunkomplex-Nephritis sowie der experimentell durch *Clostridium Toxin A*-induzierten intestinalen Entzündung (164, 165).

Leptin-Defizienz vermittelt jedoch nicht nur Protektion gegenüber entzündlichen Erkrankungen, sondern kann auch mit einem verminderten Schutz gegenüber Pathogenen assoziiert sein. So sind *ob/ob*-Mäuse anfälliger gegenüber der durch *Klebsiella pneumoniae* vermittelten Pneumonie, dies wird durch eine verminderte Clearance der Bakterien erklärt (141). *Ob/ob*-Mäuse zeigen zudem eine erhöhte Mortalität nach systemischer LPS-Applikation (166). Die erhöhte LPS-Sensibilität kann bislang nicht schlüssig erklärt werden. In der Zymosan-induzierten Arthritis kommt es bei *ob/ob*-Tieren ebenfalls zu einem verzögerten Rückgang der Entzündung (167).

Tabelle 3. Tiermodelle bei Leptin- bzw. Leptin-Rezeptor-Defizienz

Modell	Effekt	Referenz
	Protektion durch Leptin-Defizienz	
Con A-induzierte Hepatitis	Leptin-Defizienz und nicht die Adipositas schützt vor der Con A-induzierten Hepatitis	(143, 168)
Antigen-induzierte Arthritis	Protektion bei Antigen-induzierter Arthritis in *ob/ob*- und *db/db*-Tieren ist mit einer verminderten Antigen spezifischen T-Zell-Proliferation *in vitro* assoziiert	(165)
Immunkomplex-Nephritis	Leptin ist ein notwendiger Mediator für die Immunkomplex-vermittelte Glomerulonephritis	(169)
Autoimmunenzephalomyelitis (EAE)	• *Ob/ob*-Tiere sind gegen EAE geschützt; endogen erhöhte Leptinserumkonzentrationen sind mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert • Fasten (niedrigere Leptinserumkonzentrationen) verzögert den Krankheitsbeginn und mildert den Verlauf • Leptin wird von aktivierten T-Zellen in den entzündeten Arealen perineural produziert	(161, 162)
DTH*	Ausbleiben der verzögerten Immunantwort	(170)
Hautallograft	supprimierte Abstoßung**	(160)
Recallantigen	reduzierte Pfotenschwellung nach Injektion**	(160)
Kolitis		
Dextran-Sulfat-Sodium TNBS	*ob/ob*-Tiere sind geschützt, dieser Schutz kann durch Leptin-Gabe aufgehoben werden.	(87)
Transfer-Modell ($CD4^{+}CD45Rb^{high}$ *db/db* in s*cid*)	Die Entwicklung der Kolitis ist bei fehlendem Effekt von Leptin auf den OB-Rb deutlich verzögert. Leptin wird lokal von LPMC und MLN synthetisiert.	(171)
Clostridium difficile	• *ob/ob*- und *db/db*-Tiere sind vor der *Clostridium Toxin A*-induzierten intestinalen Entzündung geschützt • durch Leptin-Gabe ist diese Protektion bei *ob/ob*- nicht aber bei *db/db*-Tieren reversibel	(164)
	Erhöhte Sensibilität bei Leptin-Defizienz	
Endotoxin-induzierter Schock	*ob/ob*-Tiere zeigen eine erhöhte Mortalität, sowie eine Einschränkung der Nierenfunktion	(166, 172)
Klebsiella pneumoniae-Pneumonie	Leptin-Defizienz ist assoziiert mit einer verzögerten bakteriellen Clearance	(141)

* DTH = verzögerte Immunantwort („delayed type hypersensitivity“)

** diese Versuche wurden mit *db/db* (=OB-Rb-defizienten) Mäusen durchgeführt

3.2.4 Die Leptin-Defizienz, nicht aber die Adipositas, ist für die Protektion verantwortlich

Leptin-defiziente Mäuse sind durch den adipösen Phänotyp charakterisiert. Folglich stellt sich die Frage, in wieweit die Abwesenheit des Mediators Leptin und nicht die Adipositas selber für die beobachtete Protektion in Entzündungsmodellen verantwortlich ist. Diese Frage wurde, wie unter *2.2.1* beschrieben unter Verwendung des Modells der Con A-induzierten Hepatitis untersucht.

Die Con A-induzierte Hepatitis stellt ein Tiermodell der Autoimmunhepatitis dar (173). Con A ist ein Mitogen und induziert somit eine T-Zell-abhängige Entzündung vom Th1-Typ (173). Die Blockade von Th1-Mediatoren, wie z. B. TNFα und IL-18 ist in diesem Modell mit einem Schutz assoziiert (168, 173-175). Es konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass *ob/ob*-Mäuse im Modell der Con A-induzierten Hepatitis geschützt sind (168). Es wurden durch intravenöse GTG-Injektion adipöse Kontrolltiere generiert, die erhöhte Leptin-Serumkonzentrationen aufweisen (176). Die alleinige Protektion der Leptin-defizienten, nicht aber der adipösen Kontrolltiere, beweist, dass nicht die Adipositas, sondern Leptin als pro-inflammatorischer Mediator den kritischen Faktor darstellt. Darüber hinaus beweisen die unter *3.2.5* diskutierten Daten der Transferkolitis einen direkten stimulatorischen Effekt von Leptin auf T-Zellen in der Lamina propria.

In dem Modell der Con A-induzierten Hepatitis konnten weitere erste Hinweise auf den Effekt von Leptin auf die T-Zellpopulationen gewonnen werden. Wie bereits unter *2.2.1* beschrieben, führt die Con A-Stimulation in WT nicht aber in *ob/ob*-Tieren zu einer Hochregulation von CD69 auf $CD3^+$ T-Zellen der Leber. CD69 wird auch „very early activation antigen“, MLR-3 oder Leu-23 genannt und gehört zu der Gruppe der Typ II transmembranen Glykoproteine mit einer Lectin-bindenden Domäne Typ C (29). CD69 kann auf Zellen der hämatopoetischen Linie induziert werden, wie z. B. T-, B-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen sowie Eosinophilen (29). CD69 ist in diesem Modell aus drei Gründen von besonderem Interesse: (1) Eine erhöhte CD69-Expression ist mit einer T-Zell-Proliferation, einer erhöhten NO-, TNFα–, IL-2- und IFNγ-Produktion, sowie einer Neutrophilen-Degranulation und einer Hochregulation der IL-2Rα-Kette assoziiert (177); (2) CD69 kann durch Leptin direkt induziert werden (178); (3) Patienten mit chronischer Lebererkrankung weisen einen hohen Anteil an CD69 positiven Zellen in der Leber auf (179). Die Beobachtung, dass CD69 in *ob/ob*-Tieren nach

Con A-Injektion nicht hoch reguliert ist, deutet darauf hin, dass Leptin eine entscheidende Rolle in der T-Zellaktivierung spielt. Die fehlende T-Zellaktivierung stellt damit zumindest einen Teil des Mechanismus dar, der für die Protektion in diesem Modell verantwortlich ist.

In dem Modell der Con A-induzierten Hepatitis konnte weiter gezeigt werden, dass Leptin einen essentiellen Faktor für die Population der NK T-Zellen darstellt. $CD1^{-/-}$ Mäuse, welche keine NK T-Zellen haben, sind im Modell der Con A-induzierten Hepatitis geschützt (180). NK T-Zellen haben eine ungewöhnliche Gewebeverteilung und sind vorwiegend in der Leber zu finden, wobei die physiologische Funktion noch weitgehend unklar ist (180). In WT-Tieren ist die Con A-induzierte Hepatitis mit einer Hochregulation von Fas-Ligand und einer nachfolgenden Apoptoseinduktion und damit signifikanten Reduktion der Population der NK T-Zellen assoziiert (180). In Übereinstimmung mit früheren Studien, konnten wir eine 50%ige Reduktion von NK T-Zellen in der Leber von *ob/ob*-Tieren nachweisen (181). Darüber hinaus resultierte die Con A-Injektion in *ob/ob*-Tieren nicht in einer zusätzlichen Reduktion der NK T-Zellen, während die GTG-injizierten Tiere eine der WT-Gruppe vergleichbaren Reduktion dieser Zellpopulation nach Con A-Injektion aufwiesen (143). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Leptin-Defizienz die NK T-Zellen in zweifacher Weise beeinflusst: (1) Eine Reduktion der Zahl in der Leber sowie (2) eine Resistenz dieser Zellpopulation gegenüber der Con A-Stimulation. Der Mechanismus, wie Leptin diese Zellpopulation beeinflusst, ist bislang ungeklärt.

3.2.5 Leptin-Defizienz bei der intestinalen Entzündung

Leptin als pro-inflammatorischer Mediator in der experimentellen Kolitis

Wie in der Tabelle 3 zusammengefasst, konnte in verschiedenen *in vivo*-Modellen eine Protektion für die Leptin-defizienten *ob/ob*-Tiere gezeigt werden (130, 150, 182). Unsere Arbeiten weisen eine entscheidende pro-inflammatorische Rolle für Leptin in der akuten und chronischen DSS- sowie der TNBS-induzierten Kolitis nach (87). Die Protektion ist auf die Leptin-Defizienz zurückzuführen, da sie im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis durch Leptin-Substitution in den *ob/ob*-Tieren aufgehoben werden konnte. Die körpergewichtsadaptierte Gabe von Leptin in WT-Tieren führte in der DSS-Kolitis in Bezug auf makroskopische und histologische Parameter zu keiner Zunahme der Entzündung (87). Im Gegensatz zu diesen Daten konnte im Modell der EAE eine Zunahme

der Entzündung in Leptin-behandelten WT-Tieren verglichen mit WT-Tieren beobachtet werden (162, 163). Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Befunde könnte bei IFNγ liegen. Während IFNγ in der EAE das entscheidende Zytokin darstellt, scheint dies für die DSS-induzierte Kolitis nicht zu zutreffen. So konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass eine alleinige Blockade von IFNγ die DSS-induzierte Kolitis nicht beeinflussen kann (183, 184).

Das System der Kolonorgankultur bietet die Möglichkeit eine Vielzahl von Zytokinen, welche aus dem entzündeten Gewebe spontan freigesetzt werden, zu messen (185, 186). Unter Verwendung dieses Modells konnte bei DSS-exponierten *ob/ob*-Tieren verglichen mit DSS-exponierten WT-Tieren signifikant niedrigere Konzentrationen von IFNγ, TNFα und IL-18 gemessen werden. Experimentelle Daten zeigen, dass jedes der genannten Zytokine zu der intestinalen Entzündung beiträgt (39, 187-189). Die Produktion der Chemokine „macrophage inflammatory protein-2“ (MIP-2) und „macrophage inflammatory protein-1α“ (MIP-1α) war in der DSS- und TNBS-induzierten Kolitis bei *ob/ob*-Tieren beinahe vollständig supprimiert. Damit übereinstimmend konnte in WT- nicht aber in *ob/ob*-Tieren nach Kolitis-Induktion eine Neutrophilen-Infiltration nachgewiesen werden. In Bezug auf die Zytokinsynthese stellt Leptin einen wesentlichen Mediatoren dar, der für die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine mit verantwortlich ist. Zusätzlich kommt es in Abhängigkeit von Leptin zu einer Neutrophilen-Infiltration.

Mehrere Arbeiten aus der Literatur deuten darauf hin, dass eine Apoptose-Induktion in der entzündeten Mukosa mit einem anti-inflammatorischen Effekt assoziiert ist (190). Im Menschen konnte gezeigt werden, dass normale LPMC eine erhöhte Sensibilität gegenüber Fas-abhängiger Apoptose-Induktion aufweisen, wohingegen LPMC von Patienten mit Morbus Crohn gegenüber multiplen apoptotischen Signalwegen resistent sind (190). Es konnte bereits in früheren Arbeiten eine erhöhte Apoptoserate für Thymozyten von *ob/ob*-Tieren nachgewiesen werden (191). In der vorliegenden Arbeit zeigen LPMC isoliert aus *ob/ob*-Tieren sowohl im DSS- als auch im TNBS-Modell verglichen mit WT-Tieren eine erhöhte Apoptoserate. Da Apoptose einen entscheidenden Mechanismus bei der Eliminierung autoreaktiver T-Zellen im Kolon darstellt, könnte die hohe Apoptoserate signifikant zu der beobachteten Protektion beitragen (190).

Rolle von Leptin als T-Zellstimulus in der intestinalen Entzündung

Die Resistenz der *ob/ob*-Tiere im Modell der TNBS-induzierten Kolitis deutet auf einen entscheidenden T-Zell-stimulierenden Effekt von Leptin hin. Zur genauen Charakterisierung, ob es sich hierbei um einen direkten oder um einen indirekten Effekt auf T-Zellen handelt, wurde das $CD4^+CD45Rb^{high}$-Transfer-Modell der Kolitis eingesetzt. Es wurden $CD4^+CD45Rb^{high}$-Zellen aus OB-Rb-defizienten *db/db*-Tieren in *scid*-Mäuse transferiert und mit WT-Rezipienten verglichen. Damit ist eine Leptin-Stimulation dieser T-Zellpopulation im Falle der *db/db*-Rezipienten nicht möglich. In den unter *2.2.3* beschriebenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass nach Transfer von $CD4^+CD45Rb^{high}$-Zellen aus *db/db*-Tieren nach vier Wochen keine Kolitis nachweisbar war, wohingegen WT-Rezipienten eine makroskopische und histologische Kolitis aufwiesen. Interessanterweise war nach acht Wochen kein Unterschied zwischen den genannten Gruppen. Aus dieser Beobachtung kann geschlossen werden, dass der Leptin-Signalweg über den OB-Rb für die Generation der krankheitsinduzierenden T-Zellen nicht erforderlich ist, aber signifikant zu dem Ausmaß der Aggressivität der transferierten T-Zellen beiträgt (171). Darüber hinaus ist der OB-Rb nicht erforderlich für Migration der transferierten T-Zellen in die intestinale Mukosa sowie für die Differenzierung in $CD8^+$-Zellen. D. h. nach Transfer in eine „normale“ Umgebung entwickeln sich die Zellen zu einer dem WT vergleichbaren krankheitsinduzierenden Zellpopulation, sie benötigen nur eine längere Zeitspanne.

Db/db-Tiere haben erhöhte Kortisol-Serumkonzentrationen, es wäre daher denkbar gewesen, dass das alleinige Priming der Zellen in den Spendertieren durch die erhöhten Kortisol-Serumkonzentrationen für die beobachtete Protektion verantwortlich ist. Durch Transfer von $CD4^+CD45Rb^{high}$-Zellen aus WT-Donortieren mit erhöhten Kortisol-Serumkonzentrationen, bei denen kein Unterschied zu den WT-Tieren nachweisbar war, konnte diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Daten, die kürzlich von Myokoniatis und Kollegen publiziert wurden und zeigen konnten, dass durch Adrenalektomie die Resistenz von *ob/ob*-Tieren gegenüber *Clostridium Toxin*-induzierter Kolitis nicht beeinflusst werden kann (164).

Vergleichbar mit den Beobachtungen im Modell der DSS- bzw. der TNBS-induzierten Kolitis konnte in den ersten vier Wochen des Transfer-Modells in den *db/db*- verglichen mit den WT-Rezipienten eine erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden. Dieser

Unterschied war jedoch nach acht Wochen nicht mehr nachweisbar. Mit den beschriebenen Befunden übereinstimmend war die Freisetzung der pro-inflammatorischer Zytokine IFNγ, IL-6, IL-18 und MIP-2 während der frühen Erkrankung in *db/db*-Rezipienten signifikant reduziert, es konnte jedoch kein Unterschied bezüglich der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10, IL-4 und TGF-β gemessen werden. Das bedeutet wiederum, dass der Schutz in den ersten vier Wochen nicht auf eine generelle Reduktion der Zytokinproduktion zurückgeführt werden kann, sondern vielmehr auf eine selektive Minderproduktion der pro-inflammatorischen Zytokine. Vergleicht man frisch isolierte mit anti-CD3 stimulierten $CD4^+CD45Rb^{high}$-Zellen von WT- und *db/db*-Tieren, so produzieren die Zellen von *db/db*-Tieren signifikant weniger IFNγ verglichen mit Zellen aus WT-Tieren. Nach Kostimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 war zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied mehr festzustellen, dies lässt auf einen möglichen Defekt in einem kostimulatorischen Signalweg schließen. Weiter konnte in mehreren Kolitis-Modellen eine Rolle für den Th1-induzierenden Transkriptionsfaktor *T-bet* gezeigt werden (78). *T-bet*-defiziente Zellen produzieren signifikant weniger IFNγ und können im Transfermodell keine Kolitis induzieren. Sie zeigen damit Eigenschaften, die den *db/db*-Zellen ähneln. Wir konnten jedoch zeigen, dass kein Unterschied in der *T-bet*-Expression zwischen $CD4^+CD45Rb^{high}$-Zellen von *db/db*- und WT-Tieren nachzuweisen ist (78). Zusammenfassend, kann aus diesen Untersuchungen geschlossen werden, dass die lange Isoform OB-Rb in dem Modell der chronische Th1-vermittelten Kolitis eine entscheidende regulatorische Funktion bezüglich der T-Zellaktiviät einnimmt.

3.2.6 Lokale Leptin-Produktion im entzündlichen Infiltrat

In dem Modell der Transferkolitis konnten wir weiter zeigen, dass sowohl LPMC aus dem Kolon als auch Lymphozyten isoliert aus den drainierenden mesenterialen Lymphknoten Leptin produzieren, wohingegen dies bei Zellen, die aus gesunden Tieren isoliert wurden nicht nachweisbar war (171). Eine lokale Leptin-Produktion in einem inflammatorischen Infiltrat konnte bereits im Modell der EAE von der Arbeitsgruppe um Matarese in perineuralen entzündlichen Lymphozyten im Gehirn nachgewiesen werden (161). Unklar bleibt jedoch, welche Relevanz dieses von Lymphozyten gebildete Leptin in dem inflammatorischen Prozess einnimmt. Zur Publikation eingereichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe können diese Frage beantworten. Es wurde wiederum das Transfer-Modell eingesetzt, jedoch diesmal $CD4^+CD45Rb^{high}$-Zellen von WT oder Leptin-defizienten *ob/ob*-Tieren in immundefiziente *scid*-Tiere transferiert. D. h. im Falle der *ob/ob*-

Rezipienten, ist die transferierte T-Zellpopulation nicht in der Lage Leptin zu produzieren. Sowohl makroskopisch, als auch histologisch konnte nach dem Transfer kein Unterschied zwischen WT- und *ob/ob*-Rezipienten nachgewiesen werden. Ebenso zeigten beide Gruppen ein vergleichbares Zytokinprofil sowie Apoptoserate in der Population der LPMC. Diese Ergebnisse beweisen, dass das von Lymphozyten gebildete Leptin nicht entscheidend zu dem entzündlichen Prozess beiträgt. Diese Befunde setzen das Fettgewebe als Hauptproduzent von Leptin in ein neues Blickfeld in der Regulation des Immunsystems.

Die Leptin-Defizienz bietet keinen Schutz in der spontanen intestinalen Entzündung der IL-10 KO-Maus

Wie oben ausgeführt, spielt Leptin in der DSS-, TNBS- sowie der Transferkolitis eine kritische pro-inflammatorische Rolle (87, 171). Die Rolle von Leptin in spontan entstehenden Entzündungen ist bislang nicht untersucht. Es existiert eine einzige Studie in dem „nonobese diabetic" Modell des Typ I Diabetes in der Maus, wo die exogene Leptin-Gabe die Zerstörung der Insulin-produzierenden β-Zellen beschleunigt, assoziiert mit einer Zunahme der IFNγ-Produktion (192).

IL-10 KO-Mäuse entwickeln spontan eine chronisch intestinale Entzündung, welche durch $CD4^+$ T-Zellen vermittelt und in den ersten Wochen mit einer gesteigerten Th1-Antwort und in der späten Phase durch eine zunehmende Th2-Antwort charakterisiert wird (94, 193). Da die Kolitis der IL-10 KO-Maus durch aktivierte T-Zellen sowie Zytokine induziert wird, die auch durch Leptin reguliert werden, wurden Leptin-defiziente IL-10 KO-Tiere (IL-10 KO *ob/ob*) generiert und die Kolitisentwicklung im Verlauf untersucht. Wie unter *2.2.4* zusammengefasst zeigte sich hierbei, dass die Leptin-Defizienz den Verlauf der spontanen Kolitis in der IL-10 KO-Maus nicht beeinflussen kann (194). Ebenso war der krankheitsassoziierte Gewichtsverlust nicht abhängig von Leptin. Diese Beobachtungen stimmen mit früheren Ergebnissen überein, wo gezeigt werden konnte, dass durch die Gabe von Endotoxin, TNFα oder IL-1 auch in *ob/ob* und *db/db*-Tieren eine Anorexie induziert werden kann (195, 196). Die reduzierte Zytokinproduktion in *ob/ob*-Tieren ist meist assoziiert mit einer Protektion in dem verwendeten Tiermodell, daher ist es schwierig zwischen einem primären Effekt von Leptin auf die Zytokinsynthese und einem sekundären Effekt als Folge einer verminderten Entzündung zu unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit sind die Konzentrationen von IFNγ, IL-6 und IL-13 in den

IL-10 KO *ob/ob*- gegenüber den IL-10 KO-Tieren unverändert, folglich ist die Anwesenheit von Leptin nicht notwendigerweise für die Synthese dieser Zytokine erforderlich. Es konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass der Effekt von Leptin auf die Zytokinproduktion ganz wesentlich von dem verwendeten Stimulus abhängt (87, 168, 197, 198).

Die Tatsache, dass IL-10 KO *ob/ob*-Tiere eine den IL-10 KO-Tieren vergleichbare Kolitis entwickeln, ist konträr zu den bisherigen Daten, bei denen *ob/ob*-Tiere in verschiedenen Modellen der intestinalen Entzündung geschützt waren (87, 171). Die IL-10 KO-Maus unterscheidet sich von den anderen Modellen durch einen spontanen Barriere- und Toleranzverlust gegenüber der intestinalen Flora (199). Unsere Daten zeigen, dass bei Fehlen beider Mediatoren, der „knockout" des anti-inflammatorischen Zytokins und der damit assoziierte Toleranzverlust gegenüber der intestinalen Flora dominiert und durch die Abwesenheit von Leptin nicht kompensiert werden kann.

3.2.7 Leptin bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beim Menschen

Bei dem Versuch eine Assoziation zwischen Leptin und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen herzustellen, lag bislang der Fokus auf einer möglichen Rolle von Leptin hinsichtlich der bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auftretenden Anorexie. Während in Ratten bei TNBS-induzierter Kolitis erhöhte Leptin-Serumkonzentrationen gefunden wurden (200), gelang ein entsprechender Nachweis in Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bis vor Kurzem nicht (201, 202). In einer kürzlich publizierten Studie konnte allerdings bei Patienten mit Colitis ulcerosa mit entzündlicher Aktivität eine erhöhte Leptin-Serumkonzentration nachgewiesen werden (203). Zu bedenken ist, dass Adipozyten den Hauptproduzenten von Leptin darstellen. Bei Morbus Crohn sind Vergrößerungen des Fettgewebes um die von der Erkrankung betroffenen Darmabschnitte beschrieben (150, 204). In diesen Abschnitten konnte bei Patienten mit Morbus Crohn eine erhöhte Expression von Leptin und TNFα nachgewiesen werden (204). Dies könnte auf eine lokale Interaktion von Leptin der Adipozyten mit Lymphozyten der lokalen Lymphknoten bzw. der Darmwand hindeuten.

3.2.8 Einordnung von Leptin in die Effektoranwtort

Leptin wurde ursprünglich als Hormon beschrieben, welches zentral im Hypothalamus eine appetitregulierende Funktion ausübt. Die vorgelegten Arbeiten bestätigen funktionelle Daten der Literatur, aufgrund derer Leptin als Zytokin klassifiziert werden sollte und an der Regulation des Immunsystems beteiligt ist. Entscheidend ist hierbei, dass unsere eigenen Arbeiten aus dem Transfermodell zeigen, dass nicht der zentrale Effekt von Leptin, sondern die direkte Aktivierung von T-Zellen für diese Veränderungen verantwortlich ist.

Aus den Ergebnissen kann die Rolle von Leptin in der Effektorantwort der intestinalen Entzündung wie folgt zusammengefasst und in Abbildung 6 schematisch dargestellt werden. Das für die Entzündung relevante Leptin wird von Adipozyten gebildet und hat lokal unterschiedliche Auswirkungen. Leptin stimuliert primär T-Zellen, die nachfolgend eine vermehrte Sekretion pro-inflammatorischer, nicht aber anti-inflammatorischer Zytokine aufweisen. Diese Effekte sind assoziiert mit einer Inhibition der Apoptose sowie einer gleichzeitigen Aktivierung der T-Zellen. Vermutlich sekundär kommt es zu einer Leptin-vermittelten Infiltration von neutrophilen Granulozyten.

Die hier durchgeführten Arbeiten mit Leptin stellen im Gegensatz zu IL-18 sicherlich keinen therapeutischen Ansatzpunkt dar. Leptin kann in der intestinalen Entzündungsantwort aber eine entscheidende pro-inflammatorische Funktion zugeschrieben werden, die auf eine kritische Interaktion zwischen Fettgewebe und Immunsystem hindeutet. Die genauen Charakterisierungen dieser Interaktionen stellen die aktuellen Forschungsbemühungen unserer Arbeitsgruppe dar.

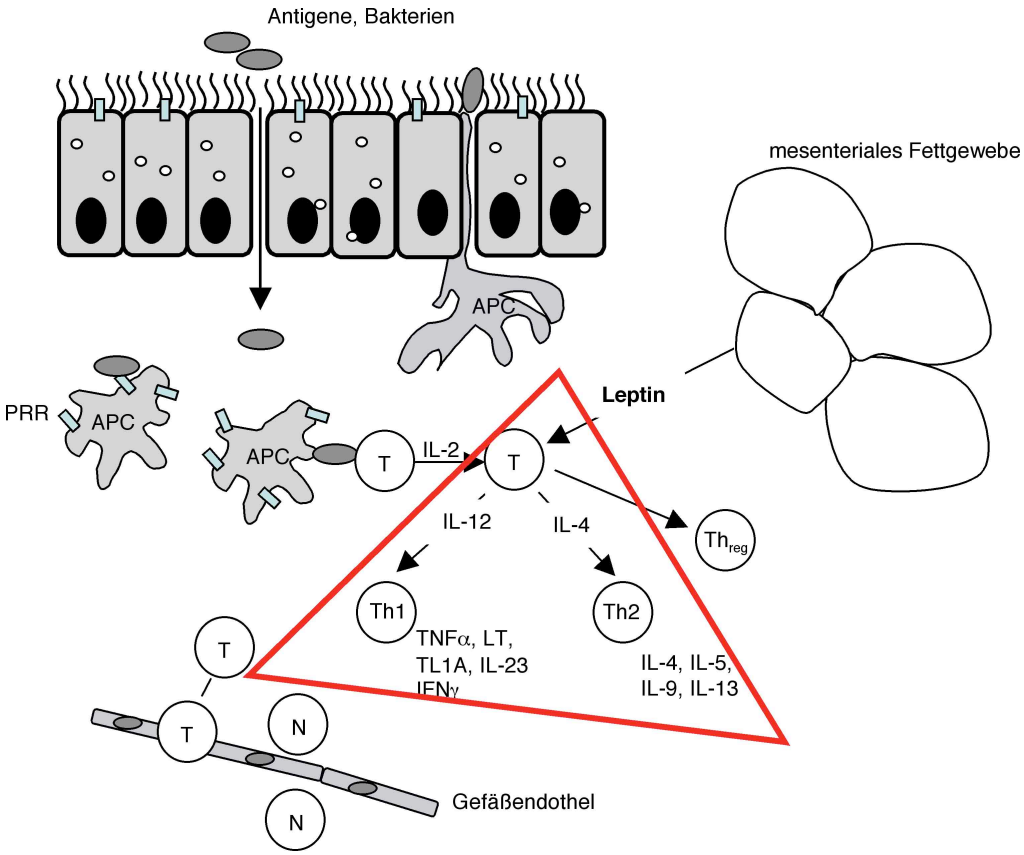

Abbildung 6. Leptin als Mediator in der intestinalen Entzündung. (APC = Antigen-präsentierende Zelle; T = T-Zelle; N = neutrophile Granulozyten; PRR = „pattern recognition receptor“).

4 Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen stellen multifaktorielle Krankheitsbilder dar. Im Mittelpunkt der Erkrankungen steht die Dysregulation des mukosalen Immunsystems ausgelöst durch bestimmte Umweltfaktoren bei vorliegender genetischer Prädisposition. Bei dieser Entzündungsreaktion wirkt ein komplexes Mediatornetzwerk auf so genannte Effektorzellpopulationen, deren Stimulation wesentlich für die beobachteten Veränderungen verantwortlich ist. Für das Verständnis der Krankheitsbilder ist es essentiell sowohl den Syntheseort als auch die Effektorzellen der einzelnen Mediatoren zu identifizieren. Somit können zum einen die Interaktionen der einzelnen Zellpopulationen besser verstanden werden, zum anderen werden mögliche Kandidaten für therapeutische Interventionen identifiziert.

Mit der vorliegenden Habilitationsschrift sind zwei dieser Mediatoren *in vivo* mit Hinblick auf die oben genannten Punkte charakterisiert und ihre Relevanz in dem Mediatornetzwerk identifiziert worden: Zum einen der Interferon-γ-induzierende Faktor IL-18, ein Zytokin der IL-1-Superfamilie, zum anderen Leptin, ein Hormon, welches aber aufgrund struktureller und funktioneller Eigenschaften als Zytokin eingeordnet werden kann. Bei beiden Mediatoren existierten Daten in der Literatur, die auf eine mögliche Rolle in der intestinalen Entzündung hingewiesen haben. Für IL-18 war sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ein Synergismus mit IL-12 vorbeschrieben, einem Zytokin dessen Blockade sowohl im Tiermodell der experimentellen Kolitis als auch bei Morbus Crohn effektiv ist. Weiter waren erhöhte Konzentrationen für IL-18 in entzündlichen Läsionen bei Patienten mit Morbus Crohn gezeigt. Von Leptin war vorbeschrieben, dass es *in vitro* pro-inflammatorische Zytokine induzieren kann, aber auch, dass Leptin-defiziente Tiere in anderen Entzündungsmodellen, wie der Kollagen-induzierten Arthritis und der Autoimmunenzephalomyelitis geschützt sind.

Um die funktionelle Relevanz *in vivo* charakterisieren zu können, wurden entweder Neutralisationsversuche durchgeführt oder aber knockout-Tiere untersucht. Für IL-18 konnte zunächst analog zu der Situation bei Patienten mit Morbus Crohn eine vermehrte Expression von IL-18 in Abhängigkeit vom Schweregrad der intestinalen Entzündung beobachtet werden. Als Hauptsyntheseorte wurden das Kolonepithel sowie die Gewebemakrophagen identifiziert. Die Neutralisation mittels eines polyklonalen Antikörpers führte makroskopisch und histologisch zu einer Suppression der Entzündung.

Dies war assoziiert mit einer verminderten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, einer verminderten T-Zellaktivierung sowie eine Induktion von Apoptose in den Lymphozyten der Lamina propria. IL-18 wird also in der Entzündungsreaktion von lokalen Zellen, dem Kolonepithel und den Gewebemakrophagen freigesetzt und übt dann einen synergistischen pro-inflammatorischen Effekt insbesondere auf T-Zellen aus, assoziiert mit einer Sekretion pro-inflammatorischer Mediatoren sowie einer anti-apoptotischen Wirkung.

Vergleichbare Effekte konnten für Leptin nachgewiesen werden, auch wenn einige entscheidende Unterschiede zwischen den beiden Mediatoren bestehen. So sind Leptin-defiziente Tiere in den Modellen der DSS- und der TNBS-induzierten Kolitis geschützt. Aufgrund des adipösen Phänotyps wurde zunächst ausgeschlossen, dass der Phänotyp selber für die beobachtete Protektion verantwortlich ist. So konnte in der DSS-induzierten Kolitis die Protektion durch adäquate Leptin-Substitution in den Leptin-defizienten Tieren aufgehoben werden. Leptin-defiziente Mäuse wiesen eine verminderte T-Zellaktivierung in der Lamina propria, eine Suppression der pro-inflammatorischen Zytokine sowie eine verminderte Infiltration neutrophiler Granulozyten auf. Grundsätzlich scheint also Leptin eine ähnliche Position in der intestinalen Entzündungskaskade einzunehmen wie IL-18, doch war zunächst unklar, ob der Effekt von Leptin wirklich direkt T-Zell-vermittelt ist, oder ob es sich hierbei um einen sekundären Effekt handelt. Unter Einsatz des Transfermodells der Kolitis konnte diese Frage beantwortet werden. Bei dem Transfer von krankheitsinduzierenden T-Zellen aus Leptin-Rezeptor-defizienten Tieren, war nach vier Wochen keine Kolitis zu erkennen, diese entwickelte sich nur sehr verzögert. Das bedeutet, Leptin stellt einen wesentlichen kostimulatorischen Faktor für die T-Zellaktivierung in der intestinalen Entzündung dar. Erstmals konnte in den Arealen der Entzündung auch im Gewebe eine lokale Leptin-Synthese durch Lymphozyten nachgewiesen werden. Transferiert man jedoch krankheitsinduzierende T-Zellen aus Leptin-defizienten Tieren, so kann bewiesen werden, dass dieses T-Zell-produzierte Leptin für den Entzündungsprozess nicht von Bedeutung ist.

Welche Konsequenzen können aus der Einordnung der Mediatoren in das Netzwerk gezogen werden? Hier unterscheiden sich die beiden Mediatoren. Bei IL-18 wurde, wie bereits in den Daten dieser Arbeit vorgelegt, durch den Einsatz spezifischer ICE-Inhibitoren, die die Aktivierung des inaktiven IL-18-Vorläuferproteins verhindern, ein

möglicher therapeutischer Ansatzpunkt untersucht. Diese Inhibitoren befinden sich bereits in klinischen Studien für rheumatoide Arthritis und stellen somit eine nahe liegende Interventionsstrategie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen dar.

Für Leptin konnten Adipozyten als Hauptproduzenten identifiziert werden und T-Zellen der Lamina propria als Effektorpopulation. Aufgrund der vielseitigen Wirkungen von Leptin erscheint eine systemische Neutralisation als therapeutische Interventionsmöglichkeit nicht geeignet. Interessanterweise konnte jedoch bei Patienten mit Morbus Crohn eine Vermehrung des mesenterialen Fetts mit Hochregulation der entzündlichen Mediatoren gezeigt werden. D. h. die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit deuten auf eine kritische Interaktion zwischen Fettgewebe und Immunsystem hin. Weitere Arbeiten werden diese Verknüpfungen und ihre Relevanz im Entzündungsprozess näher beleuchten.

5 Literaturverzeichnis

1. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. Gastroenterology 1998;115(1):182-205.

2. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between North and South? Results of the European collaborative study on inflammatory bowel disease (EC-IBD). Gut 1996;39:690-7.

3. Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobson SJ. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. Gastroenterology 1991;100:143-4.

4. Loftus EVJ, Schoenfeld P, Sandborn WJ. The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systemic review. Aliment Pharmacol Ther 2002;16(1):51-60.

5. Yang SK, Loftus EVJ, Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. Inflamm Bowel Dis 2001;7(3):260-70.

6. Duggan AE, Usmani I, Neal KR, Logan RF. Appendicetomy, childhood hygiene, Helicobacter pylori status, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study. Gut 1998;43(4):494-8.

7. Whorwell PJ, Holdstock G, Whorwell GM, Wright R. Bottle feeding, early gastroenteritis, and inflammatory bowel disease. Br Med J 1979;1(6160):382.

8. Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 1989;34:1841-54.

9. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen IA, Binder V. Familial occurence of inflammatory bowel disease. N Engl J Med 1991;324:84-88.

10. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. BMJ 1996;312:95-96.

11. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2003;124:521-36.

12. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2002;122(4):867-74.

13. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. Lancet 2001;357(9272):1925-8.

14. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001;411(6837):599-603.

15. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001;411(6837):603-6.

16. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, et al. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. Gastroenterology 2002;123(1):86-91.

17. Neurath MF, Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, et al. Mucosal immunity in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2004;10(Suppl 1):S29-31.

18. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. Nat Immunol 2004;5(8):800-8.

19. Maeda S, Hsu LC, Liu H, Bankston LA, Iimura M, Kagnoff MF, et al. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. Science 2005;307(5710):734-8.

20. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. Gut 2004;53(11):1658-64.

21. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. Science 2005;307(5710):731-4.

22. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, 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.

23. Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. Nat Genet 2004;36(5):476-80. Epub 2004 Apr 11.

24. Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J, et al. Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. Gastroenterology 2003;124(1):26-33.

25. Hoffmann JC, Zeitz M. [Standard therapy of Crohn disease. Consensus-based recommendations]. Internist (Berl) 2002;43(11):1376, 1379-85.

26. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. Gastroenterology 2004;126(6):1620-33.

27. Schultz M, Timmer A, Herfarth HH, Sartor RB, Vanderhoof JA, Rath HC. Lactobacillus GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. BMC Gastroenterol 2004;4(1):5.

28. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Büschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). Clin Exp Immunol 1995;102(3):448-55.

29. Kelsall BL, Rescigno M, Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, et al. Mucosal dendritic cells in immunity and inflammation. Nat Immunol 2004;5(11):1091-5.

30. Jang MH, Kweon MN, Iwatani K, Yamamoto M, Terahara K, Sasakawa C, et al. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101(16):6110-5. Epub 2004 Apr 07.

31. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nat Immunol 2001;2(4):361-7.

32. Becker C, Wirtz S, Blessing M, Pirhonen J, Strand D, Bechthold O, et al. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. J Clin Invest 2003;112(5):693-706.

33. Yoshida M, Claypool SM, Wagner JS, Mizoguchi E, Mizoguchi A, Roopenian DC, et al. Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. Immunity 2004;20(6):769-83.

34. Huang FP, Platt N, Wykes M, Major JR, Powell TJ, Jenkins CD, et al. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. J Exp Med 2000;191(3):435-44.

35. Malmström V, Shipton D, Singh B, Al-Shamkhani A, Puklavec MJ, Barclay AN, 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.

36. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. J Immunol 2003;170(8):3939-43.

37. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. Lancet 2002;359(9317):1541-9.

38. Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present DH, et al. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. N Engl J Med 2004;351:2069-79.

39. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. J Exp Med 1995;182(5):1281-90.

40. Neurath MF, Fuss I, Pasparakis M, Alexopoulou L, Haralambous S, Meyer zum Büschenfelde KH, et al. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. Eur J Immunol 1997;27(7):1743-50.

41. Bamias G, Martin C, 3rd, Marini M, Hoang S, Mishina M, Ross WG, et al. Expression, localization, and functional activity of TL1A, a novel Th1-polarizing cytokine in inflammatory bowel disease. J Immunol 2003;171(9):4868-74.

42. Glimcher LH, Murphy KM, Liu Z, Geboes K, Hellings P, Maerten P, et al. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. Genes Dev 2000;14(14):1693-711.

43. Mosmann TR, Sad S, Higgins LM, McDonald SA, Whittle N, Crockett N, et al. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today 1996;17(3):138-46. inhibit ongoing T cell reactions in the gut.

44. Romagnani S, Harton JA, Linhoff MW, Zhang J, Ting JP. The Th1/Th2 paradigm. Immunol Today 1997;18(6):263-6.

45. Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W, Bhan AK, Terhorst C. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. J Exp Med 1998;188(10):1929-39.

46. Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. Annu Rev Immunol 1999;17(3):255-81.

47. Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. Immunity 2002;17(5):629-38.

48. Strober W. Epithelial cells pay a Toll for protection. Nat Med 2004;10(9):898-900.

49. Kobayashi M, Kweon MN, Kuwata H, Schreiber RD, Kiyono H, Takeda K, et al. Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. J Clin Invest 2003;111(9):1297-308.

50. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. Annu Rev Immunol 2002;20:495-549.

51. Schurmann G. [Cell adhesion. Molecular principles and intial implications for surgery]. Chirurg 1997;68(5):477-87.

52. Vermeire S, Rutgeerts P. Novel biological strategies in inflammatory bowel diseases. Inflamm Bowel Dis 2004;10(Suppl 1):S44-51.

53. Zbar AP, Simopoulos C, Karayiannakis AJ. Cadherins: an integral role in inflammatory bowel disease and mucosal restitution. J Gastroenterol 2004;39(5):413-21.

54. Picarella D, Hurlbut P, Rottman J, Shi X, Butcher E, Ringler DJ. Monoclonal antibodies specific for beta 7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45RBhigh $CD4^+$ T cells. J Immunol 1997;158(5):2099-106.

55. Yacyshyn BR, Bowen-Yacyshyn MB, Jewell L, Tami JA, Bennett CF, Kisner DL, et al. A placebo-controlled trial of ICAM-1 antisense oligonucleotide in the treatment of Crohn's disease. Gastroenterology 1998;114(6):1133-42.

56. Ghosh S, Goldin E, Gordon FH, Malchow HA, Rask-Madsen J, Rutgeerts P, et al. Natalizumab for active Crohn's disease. N Engl J Med 2003;348(1):24-32.

57. Ohkusa T, Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, et al. [Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora]. Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi 1985;82(5):1327-36.

58. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R, et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. Gastroenterology 1990;98(3):694-702.

59. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. Exp Anim 1999;48(3):137-43.

60. Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. Clin Exp Immunol 1998;114(3):385-91.

61. Axelsson LG, Landstrom E, Goldschmidt TJ, Gronberg A, Bylund-Fellenius AC. Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. Inflamm Res 1996;45(4):181-91.

62. Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. Gastroenterology 1994;107(6):1643-52.

63. Murthy SN, Cooper HS, Shim H, Shah RS, Ibrahim SA, Sedergran DJ. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. Dig Dis Sci 1993;38(9):1722-34.

64. Takizawa H, Shintani N, Natsui M, Sasakawa T, Nakakubo H, Nakajima T, et al. Activated immunocompetent cells in rat colitis mucosa induced by dextran sulfate sodium and not complete but partial suppression of colitis by FK506. Digestion 1995;56(3):259-64.

65. Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, Mannel DN, Andus T, Schölmerich J, et al. Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. Clin Exp Immunol 1997;107(2):353-8.

66. Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Kuroda M, Kokura S, Ichikawa H, et al. Reduced intestinal inflammation induced by dextran sodium sulfate in interleukin-6-deficient mice. Int J Mol Med 2004;14(2):191-6.

67. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neirynck S, Obermeier F, Falk W, et al. Treatment of murine colitis by lactococcus lactis secreting interleukin-10. Science 2000;289(5483):1352-5.

68. Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99(22):14338-43. Epub 2002 Oct 10.

69. Sundberg JP, Elson CO, Bedigian H, Birkenmeier EH. Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. Gastroenterology 1994;107(6):1726-35.

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

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

72. Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. Cell 1993;75(2):274-82.

73. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, et al. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90(2):770-4.

74. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. Nature 1992;359(6397):693-9.

75. Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. Immunity 1999;10(3):387-98.

76. Matsumoto S, Okabe Y, Setoyama H, Takayama K, Ohtsuka J, Funahashi H, et al. Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. Gut 1998;43(1):71-8.

77. Rudolph U, Finegold MJ, Rich SS, Harriman GR, Srinivasan Y, Brabet P, et al. Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G alpha i2-deficient mice. Nat Genet 1995;10(2):143-50.

78. Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, Glickman J, Nieuwenhuis E, Iijima H, et al. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. J Exp Med 2002;195(9):1129-43.

79. Wirtz S, Finotto S, Kanzler S, Lohse AW, Blessing M, Lehr HA, et al. Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN-gamma-producing CD4+ T cells that respond to bacterial antigens. J Immunol 1999;162(4):1884-8.

80. Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Okamoto S, Hayashi T, Yamazaki M, et al. Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. J Exp Med 1998;187(3):389-402.

81. Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, mdr1a, spontaneously develop colitis. J Immunol 1998;161(10):5733-44.

82. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. Int Immunol 1993;5(11):1461-71.

83. Hollander GA, Simpson SJ, Mizoguchi E, Nichogiannopoulou A, She J, Gutierrez-Ramos JC, et al. Severe colitis in mice with aberrant thymic selection. Immunity 1995;3(1):27-38.

84. Snapper SB, Rosen FS, Mizoguchi E, Cohen P, Khan W, Liu CH, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation. Immunity 1998;9(1):81-91.

85. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. Gastroenterology 1989;96(3):795-803.

86. Abraham R, Fabian RJ, Golberg L, Coulston F, Huang FP, Platt N, et al. Role of lysosomes in carrageenan-induced cecal ulceration. Gastroenterology 1974;67(6):1169-81.

87. Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G. Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice. Gastroenterology 2002;122(7):2011-25.

88. Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li F, Linde HJ, et al. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. Infect Immun 2001;69(4):2277-85.

89. Kanai T, Watanabe M, Okazawa A, Sato T, Yamazaki M, Okamoto S, et al. Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease. Gastroenterology 2001;121(4):875-88.

90. Ten Hove T, Corbaz A, Amitai H, Aloni S, Belzer I, Graber P, et al. Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF-alpha production in mice. Gastroenterology 2001;121(6):1372-9.

91. Fuss IJ, Marth T, Neurath MF, Pearlstein GR, Jain A, Strober W. Anti-interleukin 12 treatment regulates apoptosis of Th1 T cells in experimental colitis in mice. Gastroenterology 1999;117(5):1078-88.

92. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J Exp Med 1989;170:2081-2095.

93. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol 2001;19:683-765.

94. Spencer DM, Veldman GM, Banerjee S, Willis J, Levine AD. Distinct inflammatory mechanisms mediate early versus late colitis in mice. Gastroenterology 2002;122(1):94-105.

95. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL, et al. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. Immunity 1994;1(7):553-62.

96. Claesson MH, Bregenholt S, Bonhagen K, Thoma S, Moller P, Grusby MJ, et al. Colitis-inducing potency of CD4+ T cells in immunodeficient, adoptive hosts depends on their state of activation, IL-12 responsiveness, and CD45RB surface phenotype. J Immunol 1999;162(6):3702-10.

97. Leach MW, Bean AG, Mauze S, Coffman RL, Powrie F. Inflammatory bowel disease in C.B-17 scid mice reconstituted with the CD45RBhigh subset of CD4+ T cells. Am J Pathol 1996;148(5):1503-15.

98. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. J Exp Med 1999;190(7):995-1004.

99. Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman RL. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. J Exp Med 1996;183(6):2669-74.

100. Aranda R, Sydora BC, McAllister PL, Binder SW, Yang HY, Targan SR, et al. Analysis of intestinal lymphocytes in mouse colitis mediated by transfer of CD4+, CD45RBhigh T cells to SCID recipients. J Immunol 1997;158(7):3464-73.

101. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. Nature 1995;378(6552):88-91.

102. Dinarello CA. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. J Allergy Clin Immunol 1999;103(1 Pt 1):11-24.

103. Bazan JF, Timans JC, Kaselein RA. A newly defined interleukin-1? Nature 1996;379:591.

104. Puren AJ, Fantuzzi G, Dinarello CA. Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96(5):2256-61.

105. Tone M, Thompson SA, Tone Y, Fairchild PJ, Waldmann H. Regulation of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) gene expression. J Immunol 1997;159(12):6156-63.

106. Torigoe K, Ushio S, Okura T, Kobayashi S, Taniai M, Kunikata T, et al. Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. J Biol Chem 1997;272(41):25737-42.

107. Parnet P, Garka KE, Bonnert TP, Dower SK, Sims JE. IL-1Rrp is a novel receptor-like molecule similar to the type I interleukin-1 receptor and its homologues T1/ST2 and IL-1R AcP. J Biol Chem 1996;271(8):3967-70.

108. Born TL, Thomassen E, Bird TA, Sims JE. Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling. J Biol Chem 1998;273(45):29445-50.

109. Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, et al. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein. J Immunol 1996;156(11):4274-9.

110. Siegmund B. Interleukin-1beta converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. Biochem Pharmacol 2002;64(1):1-8.

111. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell 1996;87(2):171.

112. Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, et al. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin- 1beta converting enzyme. Science 1997;275(5297):206-9.

113. Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. Nature 1994;370(6487):270-5.

114. Schönbeck U, Mach F, Bonnefoy JY, Loppnow H, Flad HD, Libby P. Ligation of CD40 activates interleukin 1beta-converting enzyme (caspase- 1) activity in vascular smooth muscle and endothelial cells and promotes elaboration of active interleukin 1beta. J Biol Chem 1997;272(31):19569-74.

115. McAlindon ME, Hawkey CJ, Mahida YR. Expression of interleukin 1 beta and interleukin 1 beta converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. Gut 1998;42(2):214-9.

116. Young JL, Sukhova GK, Foster D, Kisiel W, Libby P, Schönbeck U. The serpin proteinase inhibitor 9 is an endogenous inhibitor of interleukin 1beta-converting enzyme (caspase-1) activity in human vascular smooth muscle cells. J Exp Med 2000;191(9):1535-44.

117. Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin- 1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)- 32-like proteases. J Exp Med 1997;185(4):601-7.

118. Li J, Billiar TR, Talanian RV, Kim YM. Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. Biochem Biophys Res Commun 1997;240(2):419-24.

119. Kim YM, Talanian RV, Li J, Billiar TR. Nitric oxide prevents IL-1beta and IFN-gamma-inducing factor (IL-18) release from macrophages by inhibiting caspase-1 (IL-1beta-converting enzyme). J Immunol 1998;161(8):4122-8.

120. Nakamura S, Otani T, Ijiri Y, Motoda R, Kurimoto M, Orita K. IFN-gamma-dependent and -independent mechanisms in adverse effects caused by concomitant administration of IL-18 and IL-12. J Immunol 2000;164(6):3330-6.

121. Barbulescu K, Becker C, Schlaak JF, Schmitt E, Meyer zum Büschenfelde KH, Neurath MF. IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes. J Immunol 1998;160(8):3642-7.

122. Chikano S, Sawada K, Shimoyama T, Kashiwamura SI, Sugihara A, Sekikawa K, et al. IL-18 and IL-12 induce intestinal inflammation and fatty liver in mice in an IFN-gamma dependent manner. Gut 2000;47(6):779-86.

123. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF, Jr., Foley E, et al. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. J Immunol 1999;162(11):6829-35.

124. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, et al. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. J Immunol 1999;163(1):143-7.

125. Hausberger FX. Parabiosis and transplantation experiments in hereditary obese mice. Anat Rec 1959;130:313.

126. Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. Diabetologia 1978;14(3):141-8.

127. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 1994;372(6505):425-32.

128. Ahima RS, Flier JS. Leptin. Annu Rev Physiol 2000;62:413-37.

129. Tartaglia LA. The leptin receptor. J Biol Chem 1997;272(10):6093-6.

130. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. Nat Rev Immunol 2004;4(5):371-9.

131. Hileman SM, Tornoe J, Flier JS, Bjorbaek C. Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform ObRa in Madin-Darby Canine Kidney cells. Endocrinology 2000;141(6):1955-61.

132. Zabeau L, Lavens D, Peelman F, Eyckerman S, Vandekerckhove J, Tavernier J. The ins and outs of leptin receptor activation. FEBS Lett 2003;546(1):45-50.

133. Huang L, Wang Z, Li C. Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. J Biol Chem 2001;276(9):6343-9. Epub 2000 Dec 1.

134. Hardwick JCH, Van den Brink GR, Offerhaus GJ, Van Deventer SJH, Peppelenbosch MP. Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. Gastroenterology 2001;121:79-90.

135. Fong TM, Huang RR, Tota MR, Mao C, Smith T, Varnerin J, et al. Localization of leptin binding domain in the leptin receptor. Mol Pharmacol 1998;53(2):234-40.

136. Devos R, Guisez Y, Van der Heyden J, White DW, Kalai M, Fountoulakis M, et al. Ligand-independent dimerization of the extracellular domain of the leptin receptor and determination of the stoichiometry of leptin binding. J Biol Chem 1997;272(29):18304-10.

137. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell 1995;83(7):1263-71.

138. Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG, Jr. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. J Biol Chem 2000;275(19):14563-72.

139. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. Nature 1998;394(6696):897-901.

140. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Bloom SR, Lechler RI. Leptin inhibits the anti-CD3-driven proliferation of peripheral blood T cells but enhances the production of proinflammatory cytokines. J Leukoc Biol 2002;72(2):330-8.

141. Mancuso P, Gottschalk A, Phare SM, Peters-Golden M, Lukacs NW, Huffnagle GB. Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in gram-negative pneumonia. J Immunol 2002;168(8):4018-24.

142. Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, et al. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93(25):14564-8.

143. Siegmund B, Lear-Kaul KC, Faggioni R, Fantuzzi G. Leptin deficiency, not obesity, protects mice from Con A-induced hepatitis. Eur J Immunol 2002;32(2):552-60.

144. Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C. Human leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells: activation of the JAK-STAT pathway. Cell Immunol 2001;211(1):30-6.

145. Ozata M, Ozdemir IC, Licinio J. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. J Clin Endocrinol Metab 1999;84(10):3686-95.

146. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. J Clin Invest 2002;110(8):1093-103.

147. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. Nature 1997;387(6636):903-8.

148. Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD, Montague CT, et al. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. Nat Genet 1998;18(3):213-5.

149. Palacio A, Lopez M, Perez-Bravo F, Monkeberg F, Schlesinger L, Ozata M, et al. Leptin levels are associated with immune response in malnourished infants. J Clin Endocrinol Metab 2002;87(7):3040-6.

150. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. J Leukoc Biol 2000;68(4):437-46.

151. Siegmund B, Fantuzzi G, Rieder F, Gamboni-Robertson F, Lehr HA, Hartmann G, et al. Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2001;281(4):R1264-73.

152. Wirtz S, Becker C, Blumberg R, Galle PR, Neurath MF. Treatment of T cell-dependent experimental colitis in SCID mice by local administration of an adenovirus expressing IL-18 antisense mRNA. J Immunol 2002;168(1):411-20.

153. Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, et al. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL- 18 binding protein to inhibit IL-18. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97(3):1190-5.

154. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. Nat Med 2000;6(5):583-8.

155. Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G, Dinarello CA. IL-1beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98(23):13249-54.

156. Siegmund B, Zeitz M. Pralnacasan Vertex Pharmaceuticals. IDrugs 2003;6(2):154-58.

157. Randle JC, Harding MW, Ku G, Schönharting M, Kurrle R. ICE/Caspase-1 inhibitors as novel anti-inflammatory drugs. Expert Opin Investig Drugs 2001;10(7):1207-9.

158. Loher F, Bauer C, Schmall K, Hallwachs R, Loehr C, Siegmund B, et al. The ICE inhibitor, pralnacasan, reduces DSS-induced murine colitis and Th1-cell activation. Gastroenterology 2002;122(Suppl. 1 A1-688):T971 (abstract).

159. Batra A, Fedke I, Wittig BM, Zeitz M, Randle J, Siegmund B. Specific Inhibition of ICE protects from Th1 as well as from Th2-mediated colitis. Gastroenterology 2004;126:Suppl. 2; M1020 (abstract).

160. Mandel MA, Mahmoud AA. Impairment of cell-mediated immunity in mutation diabetic mice (db/db). J Immunol 1978;120(4):1375-7.

161. Sanna V, Di Giacomo A, La Cava A, Lechler RI, Fontana S, Zappacosta S, et al. Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. J Clin Invest 2003;111(2):241-50.

162. Matarese G, Sanna V, Di Giacomo A, Lord GM, Howard JK, R. BS, et al. Leptin potentiates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL female mice and confers susceptibility to males. Eur J Immunol 2001;31:1324-32.

163. Matarese G, Di Giacomo A, Sanna V, Lord GM, Howard JK, Di Tuoro A, et al. Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 2001;166(10):5909-16.

164. Mykoniatis A, Anton PM, Wlk M, Wang CC, Ungsunan L, Bluher S, et al. Leptin mediates Clostridium difficile toxin A-induced enteritis in mice. Gastroenterology 2003;124(3):683-691.

165. Busso N, So A, Chobaz-Peclat V, Morard C, Martinez-Soria E, Talabot-Ayer D, et al. Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis. J Immunol 2002;168(2):875-82.

166. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94(6):2557-62.

167. Bernotiene E, Palmer G, Talabot-Ayer D, Szalay-Quinodoz I, Aubert ML, Gabay C. Delayed resolution of acute inflammation during zymosan-induced arthritis in leptin-deficient mice. Arthritis Res Ther 2004;6(3):R256-63. Epub 2004 Apr 26.

168. Faggioni R, Jones-Carson J, Reed DA, Dinarello CA, Feingold KR, Grunfeld C, et al. Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97(5):2367-72.

169. Tarzi RM, Cook HT, Jackson I, Pusey CD, Lord GM. Leptin-deficient mice are protected from accelerated nephrotoxic nephritis. Am J Pathol 2004;164(2):385-90.

170. Chandra RK. Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93(25):14304-7.

171. Siegmund B, Sennello JA, Jones-Carson J, Gamboni-Robertson F, Lehr HA, Batra A, et al. Leptin receptor expression on T lymphocytes modulates chronic intestinal inflammation in mice. Gut 2004;53(7):965-972.

172. Wang W, Poole B, Mitra A, Falk S, Fantuzzi G, Lucia S, et al. Role of leptin deficiency in early acute renal failure during endotoxemia in ob/ob mice. J Am Soc Nephrol 2004;15(3):645-9.

173. Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. J Clin Invest 1992;90(1):196-203.

174. Gantner F, Leist M, Lohse AW, Germann PG, Tiegs G. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. Hepatology 1995;21(1):190-8.

175. Ksontini R, Colagiovanni DB, Josephs MD, Edwards CK, Tannahill CL, Solorzano CC, et al. Disparate roles for TNF-alpha and Fas ligand in concanavalin A-induced hepatitis. J Immunol 1998;160(8):4082-9.

176. Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, et al. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94(13):7001-5.

177. Marzio R, Mauel J, Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. Immunopharmacol Immunotoxicol 1999;21(3):565-82.

178. Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V. Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. Cell Immunol 2000;199(1):15-24.

179. Garcia-Monzon C, Moreno-Otero R, Pajares JM, Garcia-Sanchez A, Lopez-Botet M, de Landazuri MO, et al. Expression of a novel activation antigen on intrahepatic CD8+ T lymphocytes in viral chronic active hepatitis. Gastroenterology 1990;98(4):1029-35.

180. Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97(10):5498-503.

181. Guebre-Xabier M, Yang S, Lin HZ, Schwenk R, Krzych U, Diehl AM. Altered hepatic lymphocyte subpopulations in obesity-related murine fatty livers: potential mechanism for sensitization to liver damage. Hepatology 2000;31(3):633-40.

182. Matarese G, La Cava A. The intricate interface between immune system and metabolism. Trends Immunol 2004;25(4):193-200.

183. Bregenholt S, Brimnes J, Nissen MH, Claesson MH. In vitro activated CD4+ T cells from interferon-gamma (IFN-gamma)- deficient mice induce intestinal inflammation in immunodeficient hosts. Clin Exp Immunol 1999;118(2):228-34.

184. Camoglio L, te Velde AA, de Boer A, ten Kate FJ, Kopf M, van Deventer SJ. Hapten-induced colitis associated with maintained Th1 and inflammatory responses in IFN-gamma receptor-deficient mice. Eur J Immunol 2000;30(5):1486-95.

185. Morteau O, Morham SG, Sellon R, Dieleman LA, Langenbach R, Smithies O, et al. Impaired mucosal defense to acute colonic injury in mice lacking cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2. J Clin Invest 2000;105(4):469-78.

186. Suzuki A, Hanada T, Misuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, et al. CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation in intestinal inflammation. J Exp Med 2001;193(4):471-81.

187. Ferretti M, Casini-Raggi V, Pizarro TT, Eisenberg SP, Nast CC, Cominelli F. Neutralization of endogenous IL-1 receptor antagonist exacerbates and prolongs inflammation in rabbit immune colitis. J Clin Invest 1994;94(1):449-53.

188. Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W. Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. Clin Exp Immunol 1999;116(2):238-45.

189. Siegmund B, Rieder F, Albrich S, Wolf K, Bidlingmaier C, Firestein GS, et al. Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice. J Pharmacol Exp Ther 2001;296(1):99-105.

190. Neurath MF, Finotto S, Fuss I, Boirivant M, Galle PR, Strober W. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. Trends Immunol 2001;22(1):21-6.

191. Howard JK, Lord GM, Matarese G, Vendetti S, Ghatei MA, Ritter MA, et al. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. J Clin Invest 1999;104(8):1051-9.

192. Matarese G, Sanna V, Lechler RI, Sarvetnick N, Fontana S, Zappacosta S, et al. Leptin accelerates autoimmune diabetes in female NOD mice. Diabetes 2002;51(5):1356-61.

193. Rennick DM, Fort MM. Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10(-/-) mice and intestinal inflammation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2000;278(6):G829-33.

194. Siegmund B, Sennello JA, Lehr HA, Batra A, Fedke I, Zeitz M, et al. Development of intestinal inflammation in double IL-10- and leptin-deficient mice. J Leukoc Biol 2004;76(4):782-6.

195. Faggioni R, Fuller J, Moser A, Feingold KR, Grunfeld C. LPS-induced anorexia in leptin-deficient (ob/ob) and leptin receptor-deficient (db/db) mice. Am J Physiol 1997;273(1 Pt 2):R181-6.

196. Plata-Salaman CR, Vasselli JR, Sonti G. Differential responsiveness of obese (fa/fa) and lean (Fa/Fa) Zucker rats to cytokine-induced anorexia. Obes Res 1997;5(1):36-42.

197. Faggioni R, Fantuzzi G, Gabay C, Moser A, Dinarello CA, Feingold KR, et al. Leptin deficiency enhances sensitivity to endotoxin-induced lethality. Am J Physiol 1999;276(1 Pt 2):R136-42.

198. Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. Faseb J 1998;12(1):57-65.

199. Madsen KL, Jijon H. IL-10 and IL-2 knockout mice effect on intestinal inflammation in mice. In: Fantuzzi G, editor. Cytokine Knockouts. Totowa, NJ: Humana; 2003. p. 237-252.

200. Barbier M, Cherbut C, Aube AC, Blottiere HM, Galmiche JP. Elevated plasma leptin concentrations in early stages of experimental intestinal inflammation in rats. Gut 1998;43(6):783-90.

201. Ballinger A, Kelly P, Hallyburton E, Besser R, Farthing M. Plasma leptin in chronic inflammatory bowel disease and HIV: implications for the pathogenesis of anorexia and weight loss. Clin Sci (Colch) 1998;94(5):479-83.

202. Hoppin AG, Kaplan LM, Zurakowski D, Leichtner AM, Bousvaros A. Serum leptin in children and young adults with inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1998;26(5):500-5.

203. Tuzun A, Uygun A, Yesilova Z, Ozel AM, Erdil A, Yaman H, et al. Leptin levels in the acute stage of ulcerative colitis. J Gastroenterol Hepatol 2004;19(4):429-432.

204. Desreumaux P, Ernst O, Geboes K, Gambiez L, Berrebi D, Muller-Alouf H, et al. Inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. Gastroenterology 1999;117(1):73-81.

6 Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Martin Zeitz bedanken, der mich nach meiner Postdoczeit in seine Klinik aufgenommen und in einmaliger Form gefördert hat. Seine nachhaltige Unterstützung ermöglichte den Aufbau einer eigenen Arbeitsgruppe, sowie eine konstruktive Fortsetzung meines wissenschaftlichen und klinischen Werdegangs. Ohne diese Unterstützung und Integration wäre die Fortsetzung der wissenschaftlichen Arbeiten in dieser Unabhängigkeit undenkbar gewesen.

Die tiefen Einblicke in die Welt der Zytokinbiologie habe ich von Herrn Prof. Charles Dinarello erhalten. Mit seinem Elan und seiner Diskutierfreudigkeit konnte er die Experimente in konstruktive Bahnen lenken. Ich möchte ihm aber auch für zwei wunderschöne Jahre danken, sein kritischer Weitblick, der die Grenzen des Labors weit überschritt, wird mich immer begleiten.

In Frau Prof. Giamila Fantuzzi habe ich im Labor von Charles Dinarello eine Teampartnerin gefunden. Nur durch dieses synergistische Arbeiten sind die erzielten Ergebnisse in den zwei Jahren möglich gewesen. Es freut mich ganz besonders, dass wir diese Zusammenarbeit kontinuierlich fortgesetzt haben.

Herrn Prof. Dr. Stefan Endres konnte bereits im Rahmen meiner Doktorarbeit sowie in den Jahren danach meinen wissenschaftlichen Enthusiasmus für die mukosale Immunologie wecken. Seine Förderung und Unterstützung, sein stetiger Rat in allen späteren Entscheidungen und nicht zuletzt die einmalige Umgebung in seiner Abteilung haben mich auf diesen Weg gebracht.

Die vorliegenden Arbeiten wären nicht möglich geworden ohne exzellente Mitarbeiter und Kollegen. Um nur einige wenige zu nennen: München (PD Dr. A, Eigler, PD Dr. G. Hartmann, Dr. A. Krug), Denver (Dr. P. Bufler, Dr. S.H. Kim, Dr. L. Shapiro, Dr. V.Y. Melnikov, T. Azam), Berlin (Dr. A. Batra, R. Glauben, I. Fedke, L. Deban, J. Pietsch, B. Okur und T. Stroh).

Ein großer Dank an meine Familie, die über viele Jahre durch Unterstützung und Verständnis meinen wissenschaftlichen Weg ermöglichte.

Eidesstattliche Versicherung

gemäß der Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich – **Dr. med. Britta Siegmund**, geb. 25.10.1971 -, dass

keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungen gegen mich anhängig sind, weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde, die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,

der Bewerberin die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

....

Datum Unterschrift