

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Morbus Crohn

Der Morbus Crohn ist eine chronisch rezidivierend verlaufende Entzündung des Darmes unklarer Genese. Er tritt mit steigender Inzidenz vorwiegend in hochindustrialisierten Ländern auf, es besteht eine ethnische und familiäre Häufung. 1913 wurde das Krankheitsbild erstmals von Dalziel (1) beschrieben und gehört heute mit der rheumatoiden Arthritis und der Psoriasis zu den häufigsten chronischen nicht-infektiösen Entzündungskrankheiten (2). Die Prävalenz liegt in Europa bei 30-90/10⁵ Einwohnern, die Inzidenz etwa bei 6/10⁵ Einwohnern (3). Die Erstmanifestation tritt typischerweise zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr auf (3, 4, 5, 6). Der gesamte Gastrointestinaltrakt kann befallen werden. Leitsymptome sind Bauchschmerzen und Diarrhö, ansonsten ist das klinische Bild vielfältig und variabel, je nach Lokalisation, Intensität und Folgeerscheinungen der Entzündung. Da sich diese durch alle Schichten der Darmwand ziehen kann, sind typische sekundäre Prozesse Stenosen und Fistelbildungen, die wiederum intestinale Obstruktionen und Abszesse verursachen können. Auch extraintestinale Manifestationen wie Arthritis, Uveitis, Erythema nodosum und Pyoderma Gangränosum können auftreten. Pathognomonische Zeichen gibt es nicht, Hinweise sind histologisch nicht verkäsende Riesenzellgranulome und radiologische Zeichen wie Pflastersteinrelief und „skip lesions“. Die Diagnose erfolgt als Ausschlussdiagnose (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Die konventionelle Therapie, 5-Aminosalizylate und Corticoide, bei Bedarf erweitert durch Immunsuppressiva (Azathioprin, Methotrexat), zielt auf die Hemmung der floriden Entzündung bzw. die Remissionserhaltung (5). Entsprechend den immunpathophysiologischen Erkenntnissen der letzten Jahre werden derzeit spezifischere Therapiekonzepte entwickelt. Monoklonale Antikörper gegen Entzündungsmediatoren oder Adhäsionsmoleküle, Blockade von Kostimulationsmolekülen, Applikation von antiinflammatorischen Zytokinen oder Förderung der Gewebeheilung über Wachstumsfaktoren bis zur Unterstützung der Darmflora durch Probiotika und des angeborenen Immunsystems durch den Granulozyten-Colony-stimulierenden Faktor (G-CSF) und den Granulozyten-Makrophagen-Colony-stimulierenden Faktor (GM-CSF) befinden sich in der Erprobung, etabliert sind bisher anti-Tumor-Nekrose Faktor (α -TNF)-Antikörper (Infliximab, Adalimumab) (2, 3, 4, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15).

Wichtige Differentialdiagnosen sind die Colitis Ulcerosa (bei der die Entzündung nur das Colon betrifft, der Befall kontinuierlich und auf die Mucosa begrenzt ist) gastrointestinale Infektionen, intestinale Ischämien sowie Mucosaschädigungen durch nicht-steroidale Antiphlogistika.

Als Pathomechanismus des Morbus Crohn (MC) wird eine inadäquate Immunantwort gegenüber der kommensalen mikrobiellen Flora angenommen (5, 6, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18). Dabei spielen sowohl das angeborene wie auch das adaptive Immunsystem wichtige und unterschiedliche Rollen (2). Vermutlich münden auf verschiedene immunologische Ebenen einwirkende auslösende Mechanismen in eine gemeinsame, T-Zell-vermittelte, pathophysiologische Endstrecke. Unterhalten wird die chronische Entzündung dann höchstwahrscheinlich durch den massiv erhöhten Einstrom luminaler Antigene in die Lamina Propria infolge der geschädigten epithelialen Barriere (7, 10, 11, 12, 13, 14, 15)

Im Folgenden werden das gastrointestinale Immunsystem und seine Veränderungen bei MC beschrieben. Immunpathophysiologische Hypothesen des MC werden der Problematik der klinischen Aktivitätseinschätzung des MC gegenübergestellt. Daraus wird die Fragestellung der Arbeit entwickelt: die Prüfung, ob die Beschreibung des Aktivierungszustandes peripherer Lymphozyten (als spezifisch immunologische Parameter) als Ergänzung der klinischen Krankheitsaktivitätsbestimmung geeignet ist.

1.1.1 Immunpathologie des MC

1.1.1.1 Das gastrointestinale Immunsystem

Das Mucosale Immunsystem (mucosa associated lymphoid tissue MALT) ist das größte sekundäre lymphatische Organ des Körpers, es ist für die Abwehrfunktionen an den Schleimhautoberflächen verantwortlich. Das gastrointestinale Immunsystem (gut associated lymphoid tissue GALT) ist ein Bereich des MALT und integraler Teil der intestinalen Mucosa (3, 34). Dieser kommt die dialektische Aufgabe zu, einerseits die Nahrungsaufnahme zu ermöglichen und die daran beteiligten kommensalen Mikroorganismen zu tolerieren, andererseits das Eindringen schädlicher Substanzen oder Erreger zu verhindern. Die enorm große Oberfläche von ca. 300 m² und das nur einschichtige Epithel sind für eine effektive Resorption günstig, eine funktionierende Abwehr wird dadurch jedoch zur immunologischen Herausforderung (3, 5, 17, 19, 20, 34).

Die Mucosa der Darmwand besteht aus dem Epithel, der Basalmembran und der bindegewebigen Lamina Propria (LP), darunter liegen die Muskelschichten, die Subserosa und das umgebende Peritoneum. Die Mucosa enthält eine Vielzahl von aktiven Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems (3, 34). Auch die Epithelzellen üben neben ihren Barriere- und Resorptionsaufgaben zahlreiche immunologische Funktionen aus (3, 5, 6, 12, 16, 17, 21)

Erste unspezifische Verteidigungslinien sind der sezernierte Mucus mit den Defensinen, die epitheliale Barriere und die in hoher Dichte bandförmig unter den Epithelzellen liegenden Makrophagen (5, 34). Dendritische Zellen (dendritic cells, DC) bilden ein die gesamte LP durchziehendes retikuläres Netzwerk. Sie sind die hauptsächlich antigenpräsentierenden Zellen dieses Kompartiments und damit die Schnittstelle zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem (3, 6, 16, 20).

Die Lymphozyten sind in der LP zum einen Teil als Konglomerate organisiert, wie die Peyer'schen Plaques (PP) des Dünndarmes, der Appendix und die isolierten Lymphfollikel (ILF) des Colon und des Rektum (19, 23). Diese stellen einen wichtigen induktiven Part des GALT dar, in dem Antigene präsentiert und naive Lymphozyten stimuliert werden. Zum anderen Teil liegen die Lymphozyten diffus verteilt in der LP (Lamina Propria Lymphozyten LPL) und zwischen den Epithelzellen (intraepitheliale Lymphozyten IEL). Dies sind die Effektor-, Regulations- oder Memory-Lymphozyten, die nach Reifung und Wanderung durch die Zirkulation wieder in den Bereich der ersten Antigenbegegnung remigriert sind (3, 6, 17, 19, 21, 22).

Die LPL sind zu 25-40% T-Lymphozyten, diese sind zu etwa 70% CD4⁺ und zu 30% CD8⁺ und tragen fast ausschließlich den $\alpha\beta$ -TCR - eine Verteilung, die etwa der der Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL) entspricht (3). Sie unterscheiden sich von den PBL jedoch durch die häufigeren Expressionen der „Memory“-Oberflächenmarker CD45R0 bzw. CD45RA und des CD103 Antigens (23, 24, 25, 26, 27). Die IEL hingegen stellen eine spezifischere Population dar, sie sind überwiegend CD8⁺ (auch CD4⁻/CD8⁻ und CD4⁺/CD8⁺-Zellen kommen vor), und die phylogenetisch alte, eingeschränkter variable, $\gamma\delta$ - Form des T-Zell-Rezeptors ist mit 5-15% deutlich häufiger als in anderen immunologischen Kompartimenten. Sie exprimieren fast alle das epithelassozierte CD103 Antigen (3, 19, 24, 28, 30).

In der gesunden Mucosa ist der immunologische Gesamttonus hyporesponsiv (6, 16). Enterale Antigenkontakte führen überwiegend zu Ag-spezifischer Toleranzbildung über klonale T-Zell-

Anergie-, Apoptose- oder Treg-Induktion (je nach Dosis und Expositionsrythmus) (3, 15, 19, 20). Kommt es doch zu Entzündungsreaktionen, die nur bei gleichzeitiger Präsenz von kostimulatorischen Molekülen induziert werden können, so bleiben diese beim Gesunden hochkontrolliert (16). Die Effektorzellen sind überwiegend vom TH2-Typ oder haben regulatorische Funktionen (TH3, TR1, Treg). TH2-Zellen produzieren antiinflammatorische und B-Zell - unterstützende Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-10, sie proliferieren wenig, fördern stattdessen die Immunglobulinsynthese. Regulatorische Lymphozyten grenzen mittels suppressorischer Funktionen Immunantworten ein, verhindern Autoimmunität und überschießende Entzündungsreaktionen (5, 12, 16, 31). Die intestinalen reifen Plasmazellen produzieren überwiegend sIgA (3, 19, 30, 34). Infolge dessen aktiver Sekretion durch die Epithelzellen in das Lumen werden die Antigene meist schon vor Eintritt in die Mucosa abgefangen (immune exclusion). Dadurch werden Ag-Ak- Interaktionen und gewebeschädigende Entzündungsprozesse in der Mucosa vermieden.

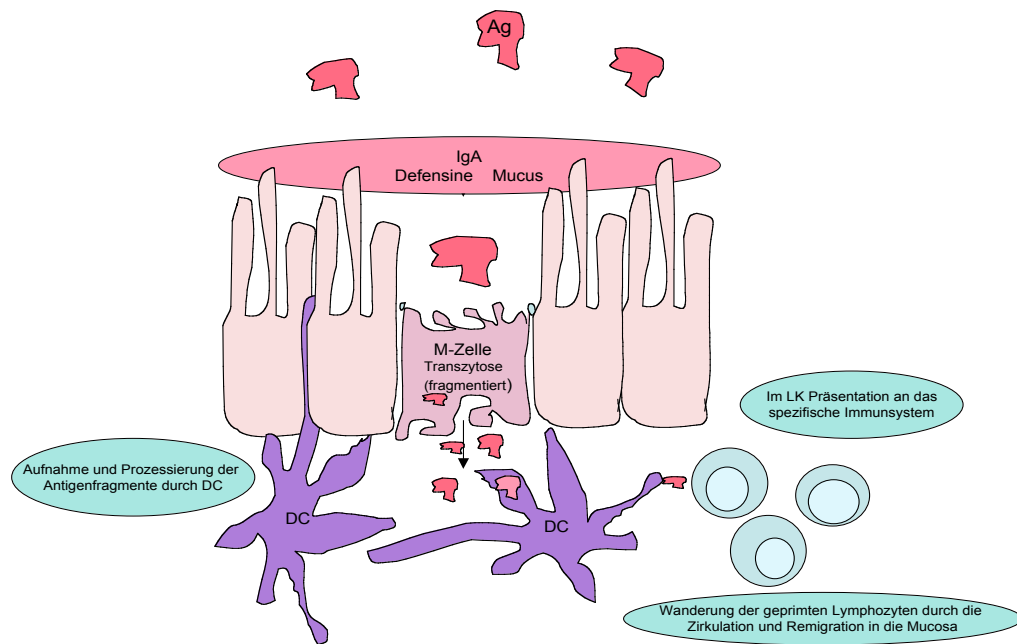


Bild1.1 Intestinale Antigenaufnahme: Antigene Substanzen des Darmlumens kommen auf folgendem Weg mit dem GALT in Kontakt: Nach Überwinden des präepithelialen Mucus und der Defensine des angeborenen Immunsystems sowie des sIgA (18, 34) werden sie von spezialisierten M-(„microfold“) Zellen, die zwischen den konventionellen Epithelzellen und vorzugsweise über den PPs liegen, aktiv per Pinocytose über deren tubulovesikuläres Transportsystem in die LP eingeschleust (34). Dort werden sie von DC aufgenommen. Ein alternativer Weg ist die direkte Aufnahme aus dem Lumen durch lange, das Epithel durchdringende, Fortsätze der DC (3, 6, 7, 16, 17, 19, 20, 21). Daraufhin wandern diese, analog den Vorgängen in anderen Lymphknoten (LK), in die mesenterialen LK und präsentieren das prozessierte Antigen den dortigen naiven Lymphozyten (21). Die antigenstimulierten Lymphozyten wandern über die efferente Lymphbahn und den Ductus Thoracicus in die Zirkulation und remigrieren später als reife Effektorzellen in die Mucosa (homing), wo sie sich als diffus verteilte LPL oder IEL niederlassen. Bei erneutem Antigenkontakt sind sie zu einer spezifischen Immunantwort fähig (3, 19).

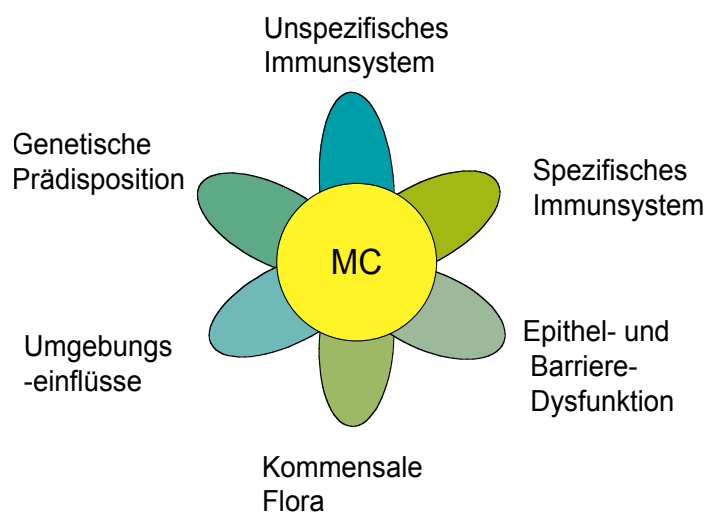
1.1.1.2 Immunpathologie des Morbus Crohn und pathogenetische Hypothesen

Das Krankheitsbild des MC verdeutlicht, wie entscheidend die epitheliale Barrierefunktion, die Differenziertheit des Zusammenspiels der verschiedenen immunologischen Ebenen sowie die Toleranz gegenüber der kommensalen Flora für eine intakte mucosale Funktion ist (6, 18). Dieses sensible immunologische Gleichgewicht ist beim MC gestört (16). Der hyporesponsive Tonus ist aufgehoben, Abwehrreaktionen werden auch auf nicht pathogene Antigene ausgelöst. Die Erkrankung kann als dysregulierte aberrante Antwort des mucosalen Immunsystems auf die intestinale Flora bei genetisch prädisponierten Personen unter bestimmten Umweltbedingungen beschrieben werden (2, 3, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17).

Die T-Zellen erscheinen inadäquat aktiviert (5, 23), die Prädominanz der TH2 T-Zellen ist aufgehoben, stattdessen überwiegen entzündungsfördernde TH1 T-Zellen (3). Die B-Zellen produzieren vermehrt IgG (IgG2) anstelle von IgA (3, 5). Dadurch findet die Ag-Ak-Auseinandersetzung im intestinalen Gewebe statt und es folgen lokale Entzündungsreaktionen mit Komplementaktivierung und Mediatorfreisetzung (3, 5). Das Zytokinmilieu ist verändert (IL12, TNF- α), die dadurch geförderte Immigration weiterer Entzündungszellen führt zur Freisetzung von Mediatoren (Prostaglandine, Leukotriene, Proteasen, Komplementfaktoren, Eikosanoide) und cytotoxischen Substanzen (Matrix-Metalloproteinasen, O₂-Radikale, NO) und damit zur Gewebedestruktion (3, 5, 6, 7, 11, 16, 35, 36, 37).

Bild 1.2 Einflussfaktoren der Immundysregulation bei MC

Die aktuellen pathogenetischen Hypothesen beziehen sich auf das spezifische Immunsystem, das unspezifische Immunsystem, die intestinale Flora und das intestinale Epithel, ergänzt durch Umwelteinflüsse und genetische Prädisposition. Erst das Zusammenspiel zweier oder mehrerer Defekte führt zu einer robusten manifesten Entzündung (7, 15, 16)



Adaptives Immunsystem

Da die sichtbare Pathologie des MC der Funktion von T-Zellen zuzuordnen ist (13, 17), liegt die Annahme einer pathogenetisch relevanten Störung ihrer Funktion oder Regulation nahe. Paradigmatisch dafür ist das verschobene Gleichgewicht zwischen Regulations- und Effektorzellen, das Überwiegen von TH1- verglichen mit TH2 T-Zellen, die präferierte Entwicklung von TH17 Zellen, die reduzierte Produktion von Treg-Zellen sowie die Apoptoseinhibition (3, 6, 10, 11, 12, 15, 16, 17). Die Ursache dafür liegt möglicherweise in einem veränderten Zytokinmilieu bei der Antigenpräsentation, ausgelöst durch gesteigerte PRR (pattern recognition receptors) Vorstimulation der DCs oder anderer Zellen des angeborenen Immunsystems (12, 16, 35). Seitdem ein verringertes MC-Risiko bei IL-23R Mutanten gefunden wurde, wird vermutet, dass das IL-23/IL-23R-System ursächlich beteiligt sein könnte. IL23 ist für die Aufrechterhaltung und weitere Expansion proinflammatorischer IL-17 produzierender TH17 Zellen notwendig und wird hauptsächlich von aktivierten dendritischen Zellen und Phagozyten produziert (6, 13, 17).

Möglich ist auch, dass durch die verbesserten Hygienebedingungen der Industrieländer und den dadurch selteneren Infektionen (besonders Würmer) weniger TH2- und Treg-T-Zellen induziert werden. Die Reduktion dieses T-Zell-Regulationsmechanismus könnte für die steigende Inzidenz mehrerer Erkrankungen mit exzessiver T-Zellaktivierung wie MC, Colitis Ulcerosa (CU), Asthma, Allergien oder Multiple Sklerose (MS) mitverantwortlich sein (7, 11, 15, 17, 37)

Angeborenes Immunsystem

Die deutliche Assoziation des MC mit NOD2/CARD15 Mutationen auf Chromosom 16 (Locus IBD 1) lenkte in den letzten Jahren die Aufmerksamkeit auf die pathogenetische Rolle des angeborenen Immunsystems (6, 7, 8, 10, 11, 16, 17, 35, 37). NOD2 steht für „nuclear oligomerization domain 2“ und CARD15 für „Caspase activation recruitment domain“. NOD Proteine gehören zu den intrazellulären „pattern recognition receptors“ (PRR) Rezeptoren, phylogenetisch hochkonservierter Blockmolekül-Erkennungsmechanismen bakterieller oder viraler Strukturen wie Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykan oder Doppelstrang DNA (3, 6, 15, 19). Sie werden extrazellulär als TLR (toll-like receptors) sowie im Zytosol als NOD-Rezeptoren exprimiert. Letztere kommen in Monozyten, Makrophagen, DCs und intestinalen Epithelzellen, besonders Panethzellen, vor und erkennen Muramyl-Dipeptid (MDP), einen Bestandteil

bakterieller Zellwände. Ihre Signale aktivieren den nuklearen Faktor NF- κ B, einen wichtigen Transkriptionsfaktor proinflammatorischer Cytokine. Auch die Defensinproduktion der Panethzellen, die bei einem Teil der MC-Patienten reduziert ist, erfolgt NOD2 abhängig (3, 6, 7, 10, 11, 13, 17, 35, 36).

Da die NOD2-Funktion die primäre antibakterielle Immunität betrifft (Autophagie, phagosomale Funktionen), könnte persistierendes bakterielles Überleben eine Ursache für die chronische inflammatorische Antwort bei MC sein (6). Die NOD2/CARD15 Mutationen sind vermutlich für 20-30% der MC Erkrankungen verantwortlich, das heißt sie sind zwar weder ausreichend noch notwendig, aber ein definitiver Risikofaktor (7, 10, 17).

Die mit dem Polymorphismus verbundene geschwächte Entzündungsbereitschaft in Form einer defizienten intrazellulären Antwort auf „low-level invasive bacteria“ könnte zwar die Granulombildung aufgrund von Akkumulation intestinalen Inhaltes erklären, kontrastiert allerdings mit den Befunden verstärkter Entzündung und der therapeutischen Wirksamkeit immunsuppressiver Medikation (8). Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass eine insuffiziente akute Entzündung zu einer überschießenden sekundären Entzündung des adaptiven Immunsystems führt (3, 6).

Diese ginge dann langfristig in den bekannten, sich selbst unterhaltenden, **chronischen** Destruktionsprozess über (8, 10, 11, 35).

Es sind mehrere genetische Assoziationen (lokale Punktmutationen, SNPs) mit IBD bekannt (3, 17, 36). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Erkrankungsrisiko durch genetische Veränderungen von Proteinen, die bakterielle

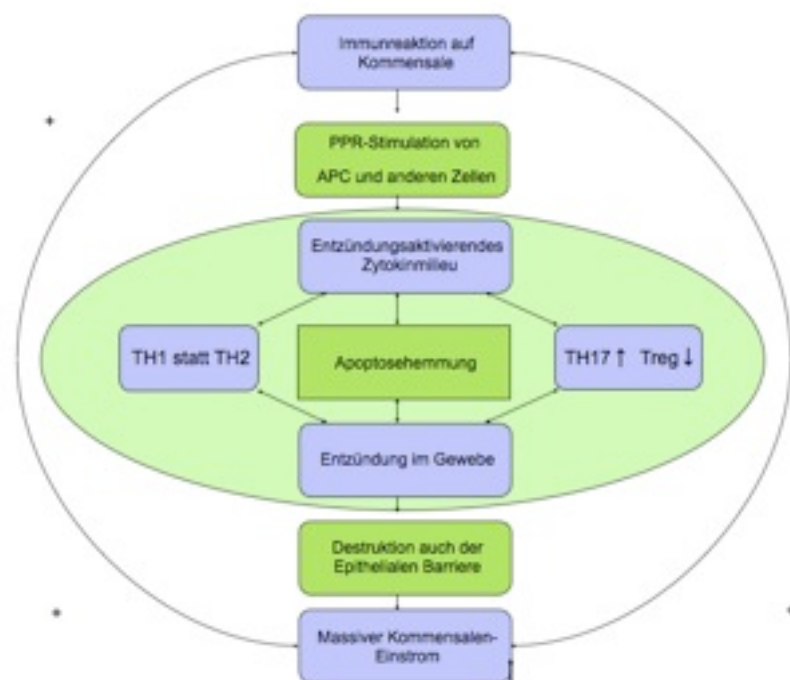


Bild 1.3 Inflammatorischer circulus vitiosus bei MC

Sobald die entzündliche Gewebedestruktion soweit vorangeschritten ist, dass der Einstrom der Kommensalen eine kritische Grenze überschreitet, unterhält sich die Entzündung selbst.

Strukturen erkennen, Adhäsionsmoleküle oder Cytokine und deren Signalwege betreffen, beeinflusst wird (17, 36). Manche mit MC assoziierte Gene sind auch mit anderen Autoimmunkrankheiten gekoppelt (6). Bei genetischen Syndromen mit Neutrophilen- und Monozyten-Dysfunktion werden ähnliche Darmentzündungen entwickelt. MC-Patienten sind auch empfänglicher für andere Folgen pathologischer Immunantworten wie Arthritis, Uveitis, aphtöse Ulcerationen und pyogene Infektionen (8).

Kommensale Flora

Die Darmflora steht in enger wechselseitiger Beziehung mit dem GALT (7, 18, 38), die Kommensalen scheinen Überlebenssignale an die Epithelzellen zu geben, die Epithelzellen ihrerseits die Toleranzmechanismen gegenüber Kommensalen einzuleiten (17). Unter keimfreien Bedingungen im Tierexperiment ist die Entwicklung aller intestinaler Strukturen deutlich beeinträchtigt, was auf den Einfluss der Flora auf epitheliale und subepitheliale Strukturen schließen lässt (5, 15, 18). Andererseits hat das GALT vermutlich einen modellierenden Einfluss auf die Mischung der bakteriellen Populationen (38). Entscheidend für eine intakte mucosale Homöostase scheint die dynamische Balance zwischen Mikroben und Abwehrtonus an der mucosalen Grenze zu sein (6, 16, 18, 38). Die genaue Zusammensetzung der Flora ist nur unvollständig erforscht, da die besonderen intrainestinalen Bedingungen experimentell kaum herstellbar sind (6, 38). Die Anzahl der kommensalen Organismen übersteigt die der gesamten Körperzellen um das Zehnfache, es wurden bisher über 400 unterschiedlich immunogene Species beschrieben (18, 19, 38). Grundsätzlich scheinen die Populationen im Rahmen der Geburt und der postnatalen Umgebung von der Mutter auf das Kind übertragen zu werden (38). Bei MC Patienten wurden bestimmte oberflächenadhäsive und intrazelluläre Keime überproportional häufig gefunden, die durch ihre invasiven Eigenschaften, eventuell über Alterierung von Epithelzellen (18), die Toleranzmechanismen möglicherweise überfordern (6, 14, 35). Diskutiert wird auch die Bedeutung von bakteriellem Flagellin, welches von vielen Bakteriengruppen exprimiert wird und an TLR5 bindet (7, 16, 17). Im Tierversuch konnte Colitis durch flagellin-reaktive T-Zellen auf gesunde Tiere übertragen werden. Dazu passt der genetische Befund, dass ein dominant negativer TLR5-Polymorphismus (loss of function) vor CD schützt (17, 35, 36).

Einige Autoren beschreiben eine intestinale bakterielle Besiedlungsveränderung hin zu größeren Konzentrationen von Bakterien, die das Epithel durchdringen und Leukotoxine produzieren können. Darauf fußt die Hypothese der Dysbiose, die eine Verschiebung des Gleichgewichtes von harmlosen zu schädlichen Bakterienpopulationen als pathogenetisches Prinzip annimmt – möglicherweise infolge langjährigen flächendeckenden Antibiotikaeinsatzes (13, 37).

Weitgehend gesichert ist, dass die Präsenz der Darmflora für das Entstehen des MC notwendig ist („no bacteria, no IBD“) (10). Auch die therapeutische Wirksamkeit von Antibiotika und Probiotika sowie die Entstehung von Erst-Läsionen in den Dünndarmbereichen hoher Bakteriendichte (terminales Ileum) weisen auf einen relevanten Beitrag der Flora hin (3, 6, 10, 11, 12, 14, 15, 17).

Epithel (Leaky-gut Hypothese)

Die intestinalen Epithelzellen haben mehrere Aufgabenbereiche. Sie bilden eine engmaschige, hochselektive Barriere zwischen der Mucosa und dem Lumen, sie sind für die Nahrungs- und Flüssigkeitsabsorption sowie –sekretion verantwortlich und führen eine Vielzahl immunologischer Funktionen aus (6, 10, 12, 13, 17).

Neben unspezifischen Abwehrfunktionen wie der Produktion von Mucus, Defensinen und Trefoilpeptiden (Paneth- und Goblet-Zellen), können sie Antigene aufnehmen, prozessieren und mit klassischen und nicht-klassischen MHC-Molekülen präsentieren. Sie produzieren Zytokine und Chemokine und exprimieren verschiedenste immunologisch relevante Oberflächenmoleküle (6). Es besteht ein beständiger Austausch zwischen dem Epithel und den Zellen des darunter liegenden Netzwerkes angeborener und adaptiver Immunzellen sowie mit der sich darüber befindenden luminalen Flora (6, 10, 18). Die die Epithelzellen verbindenden Desmosomen werden im Zusammenspiel mit Zytokinen ($\text{TNF}\alpha$, IL17, $\text{IFN}\gamma$), Chemokinen und dem darunter liegenden Immunzellen-Netzwerk dynamisch reguliert (6, 11). Die epithelspezifische NF κ B-Aktivierung oder -Suppression (über TLR oder NOD2-Rezeptoren) scheint ein entscheidender Punkt bei der Suppression oder Induktion einer Immunantwort zu sein (6, 16).

Es ist möglich, dass die erhöhte Durchlässigkeit des intestinalen Epithels nicht Folge, sondern Ursache der Entzündung ist. Diese könnte auf dem erhöhten Einstrom luminaler Antigene

infolge einer genetisch bedingten pathologischen Durchlässigkeit beruhen. Argumente für diesen Blickwinkel sind die erhöhte intestinale Permeabilität bei gesunden Verwandten von MC-Patienten, der Befund herunterregulierter Desmosomen und veränderter TLR-Expression sowie die Triggerfunktionen von nicht-steroidalen-Antiphlogistika (NSAIDs) und Cytomegalievirusinfektionen, die beide permeabilitätssteigernd wirken (6, 7, 13, 16, 17, 37).

1.1.2 Aktivitätsbeurteilung des Morbus Crohn

Die Aktivitätsbeurteilung ist bei chronisch rezidivierend verlaufenden Erkrankungen von zentraler klinischer Bedeutung. Sie gestaltet sich beim MC häufig schwierig, es existiert keine allgemein zufriedenstellende Lösung.

Die Aktivität des MC kann anhand der klinischen Symptomatik, des endoskopischen Befundes, oder laborchemischer Entzündungsparameter beschrieben werden. Ein krankheitsspezifischer Parameter ist nicht bekannt (39). Das zentrale Problem der Aktivitätsbeurteilung ist die mögliche deutliche Differenz zwischen dem klinischen Gesamtbild und der entzündlichen Aktivität im Darm. Beispielsweise können Fistel- oder Stenosenprobleme eine ausgeprägte klinische Symptomatik verursachen, ohne dass eine aktive Entzündung vorliegen muss, andererseits kann eine hochfloride Entzündung lange Zeit klinisch unauffällig bleiben (40, 41, 44).

Tabelle 1.1 Kriterien des CDAI nach Best

Symptom	Gewichtung
Zahl der unformten Stühle	x 2
Allgemeinbefinden	x 7
Hautveränderungen, Fieber, Gelenkschmerzen, Fisteln, (je Symptom)	x 20
Symptomatische Therapie der Diarrhoe	x 30
Tastbare Resistenz	x 30
Hämatokrit (Standard Hk-aktueller Hk)	x 6
Körpergewicht (1-Gewicht/Standardgewicht)	x 100
Beurteilung: <150 Remission, 150-300 milder Schub, >350 schwerer Schub	

Die wichtigsten klinischen Befunde zur Beurteilung des MC sind Stuhlfrequenz und -konsistenz, Bauchschmerzen, Fieber, abdominale Resistenzen, Allgemeinbefinden und Ernährungszustand sowie das Auftreten von Komplikationen und extraintestinalen Manifestationen. Endoskopische Kriterien sind Ausdehnung und Tiefe der Entzündung. Die (nicht krankheitsspezifischen) serologischen Laborparameter Hämoglobin, Eisen, Thrombozytenzahl, Leukozyten, BSG,

Albumin, Orosomucoid, C-reaktives Protein, und alpha-1-Antitrypsin korrelieren mit der Entzündungsintensität (5, 40, 41, 42, 43). Als Maß des (aktivierten) Phagozyten-Influx in das untere Intestinum gilt die fäkale Calprotectin-Konzentration. Sie ist ein sensitiver Marker für (auch subklinische) entzündliche intestinale Prozesse. Spezifisch für einzelne Krankheitsbilder ist sie jedoch nicht (45, 46).

Es wurden *Aktivitätsindizes* entwickelt, die die einzelnen Symptome und Befunde nach Gewichtungsschlüsseln miteinander verrechnen (5, 40, 44). Die Indices unterscheiden sich bezüglich der untersuchten Parameter und deren Gewichtung.

Der *Crohn's Disease Activity Index (CDAI)* nach Best (47) beschreibt hauptsächlich das klinische Gesamtbild, als laborchemischer Entzündungsparameter geht lediglich der Hämatokrit ein. Der CDAI wurde 1976 für die große National Cooperative Crohn's Disease Study (48) entwickelt und auch bei der entsprechenden europäischen Multicenter Studie (49) verwendet. Er ist nach wie vor die etablierteste Methode der Aktivitätsbeurteilung im Rahmen von Studien (40, 44). Kritikpunkte sind die Subjektivität der Einschätzung mancher Symptome seitens des Patienten sowie des Arztes, die für den klinischen Alltag meist zu aufwändige Bestimmung und die geringe Beachtung der laborchemischen Entzündungsparameter (41, 50, 51). *Harvey und Bradshaw* entwickelten 1980 einen eng am CDAI orientierten, jedoch unkomplizierter zu erhebenden Index (52), *Andre et al.* erweiterten den CDAI um die Entzündungsparameter Orosomucoid, BSG und CRP (51). *Van Hees et al.* entwarfen einen Index, der sich nur auf objektivierbare Labordaten und Untersuchungsbefunde stützt und bei dem die Albuminkonzentration eine wichtige Rolle spielt (53). Der *Severity-Activity-Index (SAI)* (40, 54), *der Oxford Score* (55) und *das South African Assessment* (56) versuchen unter jeweils ähnlichen Gesichtspunkten Kompromisse zwischen dem van Hees Index und dem CDAI zu finden. Die endoskopische Aktivitätsbeurteilung wurde im *Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity (CDEIS)* zusammengefasst (57).

In den letzten Jahren wurde, bezugnehmend auf den sich weiter verdeutlichenden Pathomechanismus, nach Parametern des spezifischen Immunsystems gesucht – in der Hoffnung direktere Aussagen über das mucosale Geschehen zu gewinnen. Von besonderem klinisch praktischem Interesse sind dabei Merkmale, die im peripheren Blut nachweisbar sind. Den peripheren Lymphozyten (PBL) kommt dabei als Repräsentanten des spezifischen Immunsystems in einem leicht zugänglichen Kompartiment besondere Aufmerksamkeit zu.

Die PBL sind von verschiedenen Arbeitsgruppen unter einzelnen Aspekten untersucht worden. Gesamtlymphozytenzahl, B- und T-Zellverteilung, T-Zell-Subpopulationen, cytotoxische und suppressorische Funktionen, Wachstumsverhalten und Oberflächenmarkerexpressionen und -Sekretionen wurden bestimmt (58-104). Umfassendere systematische Arbeiten, bei denen die PBL unter unterschiedlichen funktionellen und phänotypischen Aspekten und in Beziehung zum klinischen Bild des MC untersucht wurden, lagen zu Beginn dieser Arbeit nicht vor.

1.2 Lymphozytäre Entzündungsmerkmale im peripheren Blut

Generell können Zellen hinsichtlich ihrer Funktion und ihres Phänotyps beschrieben werden. Die *funktionellen Charakterisierungen* erfolgen anhand der Reaktionsfähigkeiten der Zellen auf bestimmte Bedingungen oder Reize. Als Beispiel dafür wäre die Induzierbarkeit des Zellwachstums durch proliferationsstimulierende Substanzen zu nennen. Die Messung erfolgt beispielsweise über die Einbaurrate markierter DNA-Bestandteile. Die *phänotypischen Charakterisierungen* beziehen sich auf das Erscheinungsbild der Zelle, meist auf die Expression oder Expressionsdichte bestimmter Oberflächenstrukturen, die durch das Ausmaß der Bindung epitopspezifischer Antikörper quantifiziert werden kann. In Beziehung stehen diese beiden Ansätze dadurch, dass das Erscheinungsbild einer Zelle meist Merkmale bestimmter Funktionen beinhaltet. Beispielsweise werden durch die Expression bestimmter Oberflächenrezeptoren zugehörige biochemische Prozesse ermöglicht.

Lymphozyten, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind, befinden sich in einem aktivierten Zustand. Sie exprimieren sogenannte Aktivierungsmarker, dies sind Oberflächenmoleküle, die aktivierungsassoziierte Zellfunktionen wie Proliferation, Produktion von Zytokinen oder Mediatoren über durch sie aktivierte intrazelluläre Signalwege induzieren. Der biochemische Zustand der Lymphozyten ist verändert, sie reagieren meist schneller und sensibler auf Stimulationen und zeigen ein alteriertes Sekretionsverhalten. Je nach Phase und Form der Entzündung bzw. dem Reifungs- und Funktionszustand der Zellen können diese Merkmale variieren.

Die Frage, ob mit der Beschreibung des Aktivitätszustandes der PBL die klinische Einschätzung des Ausmaßes der mucosalen Entzündung bei MC sinnvoll ergänzt oder erweitert werden kann, sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Ein besonderer Schwerpunkt lag dabei auf der

Beschreibung des für die lymphozytäre Proliferation, Differenzierung und Regulation wichtigen Interleukin-2 (IL-2)/ IL-2-Rezeptorsystems.

Die zelluläre Expression der α -Kette des IL-2R (CD25), die Konzentration des im Plasma gelösten sIL-2R sowie das Wachstum auf rekombinantes IL-2 wurden untersucht. Ergänzt wurde dieser experimentelle Ansatz durch die Bestimmung weiterer Aktivierungsmarker (CD71, CD49a und CD103) und die Analyse ihrer Verteilung auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen.

Das Wachstumsverhalten wurde zusätzlich über die Stimulation mit Mitogenen (ConA und PHA) sowie Antigenen (Tuberkulin und Tetanustoxoid) analysiert.

Interleukin-2 und der Interleukin-2-Rezeptor

Das Zytokin IL-2 ist ein kleines (15.000 kD) globuläres Glykoprotein aus vier antiparallelen α -Helices (103, 104). Es galt lange hauptsächlich als T-Zell-Wachstumsfaktor, der die klonale T-Zell-Expansion nach TCR (und CD28) Stimulation auslöst, produziert vorwiegend von aktivierten CD4⁺ Zellen (106). Inzwischen ist bekannt, dass seine biologischen Effekte wesentlich komplexer sind. Je nach Kontext fördern sie Zell-Überleben, Effektorfunktion, Gedächtnisentwicklung, Apoptose oder regulatorische Funktionen. Es sind durchaus gegensätzliche Wirkungsweisen möglich, erklärbar durch die Fähigkeit des IL-2, intrazellulär unterschiedliche biochemische Reaktionswege zu aktivieren. Essentiell scheint es für die Generierung und Erhaltung der FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen zu sein (105, 107).

Es bindet an und signalisiert durch den IL-2R, einen Rezeptorkomplex aus drei nicht kovalent gebundenen Ketten, IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) und IL-2R γ (CD132) (103, 104, 106). Mit diesem bildet es einen stabilen quarternären Ligand-Rezeptor-Komplex (105). Dieser wird auf Tregs beständig und auf aktivierten T-Zellen vorübergehend während der proliferativen Phase exprimiert (106).

Der gelöste Interleukin-2-Rezeptor (sIL-2R) ist die sezernierte Form der α -Kette des IL-2R. Er entsteht durch proteolytische Abspaltung an der Zelloberfläche. Die Sekretionsrate, und damit die Konzentration im Serum, korreliert mit der Induktion und Expression der α -Kette des IL-2R, wobei sich die stimulierten Zellen nicht unbedingt im gleichen Gewebe- oder Flüssigkeitskompartiment befinden müssen (111). Als physiologische Rolle des sIL-2R werden immunregulatorische Funktionen durch "Abfangen" von IL-2 diskutiert. (109, 110, 111). Unter normalen Bedingungen ist

der sIL-2R in niedrigen Konzentrationen im peripheren Blut nachweisbar. Erhöhte Konzentrationen wurden bei verschiedenen Erkrankungen gefunden, die man in vier Gruppen zusammenfassen kann: Malignome, autoimmune entzündliche Erkrankungen, Transplantatabstoßungen und verschiedene Infektionen (110, 112, 113-120).

Weitere untersuchte Aktivierungsmarker

CD71 (Transferrinrezeptor) ist ein 95kDa Homodimer, das generell von rasch proliferierenden und von hämoglobinsynthetisierenden Zellen aufgrund ihres Eisenbedarfes exprimiert wird (121, 122). Auf ruhenden Lymphozyten ist CD71 nur in geringer Dichte nachweisbar, auf mitogenstimulierten jedoch in hoher Anzahl (121, 122). Die IL-2R-Expression geht der des CD71 voraus (121, 125), die IL-2/IL-2R Interaktion ist Voraussetzung für sein Erscheinen (122). Wird CD71 durch monoklonale Antikörper blockiert, werden DNA-Synthese und Zellwachstum inhibiert (121, 122).

CD49a (Very-Late-Antigen, VLA-1) ist ein 200kDa Molekül aus der Gruppe der Integrine (123, 124). Dies ist eine Familie von Heterodimeren, die, bestehend aus einer großen α -Kette die nicht kovalent mit einer kleineren β -Kette verbunden ist (123, 125, 127), wichtige Funktionen bei T-Zell-Aktivierung, Homing und Effektorfunktionsausübung haben (123, 125). Ihr (meist kurzer) intrazytoplasmatischer Teil ist wahrscheinlich mit dem Cytoskelett verbunden (123), sie vermitteln Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen (124). VLA-1 assoziiert mit CD29 und bindet Kollagen und Laminin-1 (128, 123). Es ist auf peripheren T-Lymphozyten (CD4+ und CD8+) nach langer, 2-4 Wochen dauernder, mitogener und antigener in-vitro Stimulation entdeckt worden (123, 125, 126). Die T- Zellen proliferieren in diesem Stadium nicht mehr, die Expression des IL-2R ist wieder abgeklungen (125). Zu Beginn dieser Arbeit war CD49a gerade auf T-Zellen bei anderen chronischen entzündungsbedingten Erkrankungen wie auf Synovial-Lymphozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und auf peripheren Lymphozyten bei Multiple-Sklerose Patienten erhöht gefunden worden und wurde somit als neuer Marker für chronische lymphozytäre Aktivierung angesehen (125, 126).

Inzwischen ist bekannt, dass CD49a auf verschiedensten differenzierten Zellen mesenchymaler Abstammung exprimiert wird und eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen spielt. Cytokine haben eine verstärkende Wirkung, Blockade (im Tierversuch) inhibiert Entzündungsvorgänge. Auf T-Zellen wird CD49a vorwiegend von einer Gedächtniszell-Fraktion

(CD45R0+) des extrazellulären Matrixraumes exprimiert (und wird durch die Bindung an Kollagen wahrscheinlich in diesem Kompartiment gehalten). Im PB ist die Expression normalerweise sehr gering, bei intraepithelialen Lymphozyten (pulmonal, intestinal, Konjunktiven) liegt sie jedoch bei etwa 50%. Die CD45R0+CD49a+CD4+ Zellen sezernieren IFN γ und gehören zum TH1-Typ. (128).

CD103 (HML-1, human mucosal lymphocyte antigen) gehört ebenfalls zu den Integrinen. Normalerweise ist CD103 auf PBL nur geringfügig nachweisbar (129, 130). Es wird vorwiegend von CD8+ T-Zellen exprimiert und wurde ursprünglich als Marker der intraepithelialen mucosalen Lymphozyten entdeckt (26, 129), die CD103 zu >90% exprimieren. Außerdem ist es auf etwa 40% der Lamina propria-Lymphozyten (26) und zu etwa 30% auf den CD4+CD25+ Treg- Zellen der Milz zu finden (131). Generell kann es von bestimmten CD4+ und CD8+ Subgruppen sowie einigen DCs exprimiert werden (21). TGF β reguliert die Transkription (131, 132), die Expression wird durch IL-4 und IL-10 gesteigert und über IL-12 gehemmt. Der einzige bis jetzt bekannte Ligand ist E-Cadherin (21, 130, 132). Die Funktion des CD103 Antigen ist nicht genau geklärt, es scheint eine Rolle beim Homing bzw. bei der Retention und Mikrolokalisierung von T-Zellen in Epithelnähe zu haben (21, 131, 132). Auch Einfluss bei der Kostimulation zu T-Zell-Proliferation und Effektorfunktion sowie auf die Treg-T-Effektor-Balance werden diskutiert (131, 132). Es wird als Marker CD8+regulatorischer T-Zellen diskutiert, einer T-Zell-Population, die nur geringe proliferative und cytotoxische Kapazitäten hat, aber alloantigeninduzierte T-Zell-Proliferation in vitro, besonders in TH2 Mikroenvironment supprimieren kann (130).

Die CD103 Expression auf PBL ist durch Stimulation induzierbar. In einer vergleichenden Untersuchung mit CD25 (IL-2R) zeigte sich, daß die Expression der beiden Marker durch die gleichen Substanzen (ConA, PHA, TPA, Tuberkulin, Tetanustoxoid) ausgelöst werden kann, sich jedoch bezüglich ihres Zeitverlaufes und ihrer Subpopulationsverteilung unterscheiden. CD103 ist nach Stimulation später und länger andauernd nachweisbar. CD25 wird vorzugsweise auf CD4+-Zellen, CD103 auf CD8+-Zellen exprimiert. Die maximale Induzierbarkeit von CD103 ist geringer als die von CD25 (129).

Weitere stimulatorische Substanzen

Die mitogenen Lektine **Concanavalin A (ConA)** und **Phytohämagglutinin (PHA)** sind multimeren Glykoproteine pflanzlicher Herkunft, ConA wird aus *Canavalia ensiformis*, PHA aus *Phaseolus vulgaris* gewonnen. Sie sind etablierte polyklonale T-Zell-Stimulantien und binden an zelluläre Kohlenhydratstrukturen, durch Quervernetzung derselben ist vermutlich ihre stimulatorische Wirkung bedingt (133, 134).

Tuberkulin wird aus *Mykobakterium-Tuberculosis*-Kulturen gewonnen. Es ist ein klassisches T-Zell-Stimulans, klinische Anwendung findet es bei dem Tuberkulintest, bei dem es nach intrakutaner Injektion eine verzögerte Immunreaktion vom Typ 4 auslöst.

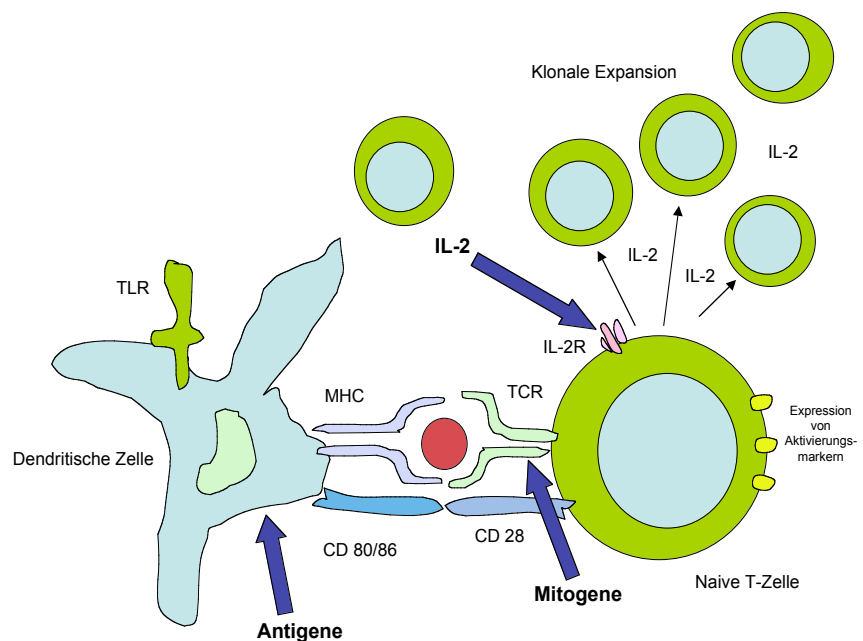
Tetanustoxoid ist die "entgiftete", jedoch noch antigen wirksame, Form des Exotoxins des *Clostridium Tetani*. Es wird durch 3-6 wöchige Fermentierung in Formaldehyd bei 30-40°C gewonnen. Üblicherweise wird es zur aktiven Tetanus-Immunisierung verwandt.

Bedingung für eine T-Zell-Proliferation auf Antigenstimulation ist eine Vorimmunisierung der Testperson.

Die erwähnten Substanzgruppen stimulieren T-Lymphozyten auf unterschiedliche Weise. Die Antigene werden von APC MHC-restringiert präsentiert (physiologischer Weg), die Mitogene setzen mittels Vernetzung von Kohlehydrat-Strukturen direkt am TCR an, IL-2 bindet an den IL2R und aktiviert dessen Signalwege, umgeht also sowohl die APC als auch den TCR.

Bild 1.4 Verschiedene Ansatzpunkte der T-Zell-Stimulation

Antigene stimulieren auf dem physiologischen Weg, sie werden von antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen, prozessiert und über den MHC-Komplex mit Hilfe kostimulatorischer Moleküle an den T-Zell-Rezeptor (TCR) der T-Zelle präsentiert. Mitogene stimulieren den TCR direkt. Interleukin-2 bindet an den Interleukin-2-Rezeptor.



1.3 Fragestellungen

Die klinische Aktivitätseinschätzung des MC ist nicht zufriedenstellend gelöst. In Anbetracht der zunehmenden Erkenntnisse über immunologischen Pathomechanismen liegt zur Erweiterung der konventionellen Aktivitätsbeurteilung die Untersuchung spezifischer immunologischer Parameter nahe. Da T-Lymphozyten bei MC an dem Destruktionsprozess der intestinalen Mucosa entscheidend beteiligt sind, wurden in dieser Arbeit Merkmale der T-Zell-Aktivierung untersucht.

Aufgrund der leichten Zugänglichkeit wurden die T-Lymphozyten des peripheren Blutes unter folgenden Fragestellungen als Untersuchungsgegenstand ausgewählt.

A. Ist der Aktivierungszustand der PBL im Zusammenhang mit der intestinalen Entzündung bei MC Patienten erhöht, erkennbar an gesteigerter Aktivierungsmarkerexpression, gesteigerter proliferativer Antwort auf Stimulation sowie erhöhtem Plasmaspiegel des sezernierten Aktivierungsmarkers sIL2R ?

B. Korreliert der Aktivierungszustand der PBL mit dem CDAI und den laborchemischen Entzündungsparametern?

C. Welche Einflüsse zeigen Befallsmuster, antiinflammatorische Therapie oder typische Komplikationen wie extraintestinale Manifestationen oder Fisteln auf den Aktivierungszustand der PBL?

D. Kann die Bestimmung des Aktivierungszustandes der PBL ein klinisch sinnvoller Beitrag zur Aktivitätsbeurteilung des MC sein?

Dazu wurde unter dem funktionellen Aspekt das Wachstum der PBL in Zellkulturen auf unterschiedliche Stimulantien gemessen. Phänotypisch wurde die Expression mehrerer aktivierungsassoziierter Oberflächenmoleküle sowie deren Verteilung auf die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen der PBL untersucht. Als sowohl funktionelles als auch phänotypisches Merkmal wurde der Plasmaspiegel des gelösten Interleukin-2-Rezeptors (sIL-2R) im Plasma bestimmt. Dieser wird von T-Zellen korrelierend zu ihrer Rezeptorexpressionsdichte proteolytisch abgespalten und in die umgebende Flüssigkeit sezerniert. Patienten mit aktiver (CDAI >150) wurden mit Patienten mit inaktiver (CDAI <150) Erkrankung sowie mit gesunden Kontrollpersonen verglichen. Es wurde die Korrelation der gewonnenen immunologischen Daten mit konventionellen laborchemischen Entzündungsparametern (C-reaktives Protein, Albuminkonzentration, Blutsenkungsgeschwindigkeit, Hämoglobinkonzentration, Hämatokrit und Thrombozytenzahl) sowie dem gebräuchlichsten klinischen Aktivitätsindex, dem CDAI, geprüft.