

Aus dem  
Charité Centrum 13  
Med. Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie  
(einschl. Ernährungsmedizin)  
Direktorin: Professorin Dr. Britta Siegmund

## **Habilitationsschrift**

### **Extrazelluläre Matrix bei entzündlichen Darmerkrankungen**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Innere Medizin und Gastroenterologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Ute Günther  
Berlin

Eingereicht: Oktober/2015  
Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries  
1. Gutachterin: Frau Prof. E. Roeb  
2. Gutachter: Hr. Prof. A. Madisch

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	5
1.1 Extrazelluläre Matrix	6
1.2 Matrix-Metalloproteinasen	8
1.3 Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen	9
1.4 Zelluläre und molekulare Modulation der extrazellulären Matrix	10
1.5 Genetische Faktoren, intestinale Mikrobiota und Fibrose	13
1.6 Vorgänge in der extrazellulären Matrix bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	14
1.7 Fragestellung	16
<b>2 Ergebnisse</b>	17
2.1 <i>Matrix Metalloproteinasen in Necrotising Enterocolitis</i>	17
2.2 <i>Connective tissue growth factor expression is increased in collagenous colitis and coeliac disease</i>	24
2.3 <i>Suppression of T Cell-mediated Injury in Human Gut by Interleukin 10: Role of Matrix Metalloproteinasen</i>	36
2.4 <i>Phenotypic Characterization of CD3-7+ Cells in Developing Human Intestine and an Analysis of Their Ability to Differentiate into T Cells</i>	49
2.5 <i>Collagen type XVIII/endostatin is differentially expressed in primary and metastatic colorectal cancers and ovarian carcinomas</i>	60
<b>3 Diskussion</b>	68
3.1 Intestinale Entzündungen mit und ohne Fibrosebildung	68
3.1.1 Vorgänge in der extrazellulären Matrix bei der nekrotisierenden Enterokolitis	68
3.1.2 Vorgänge in der extrazellulären Matrix bei der kollagenen Kolitis	70
3.1.3 Interleukin-10, Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -Antikörper und extrazelluläre Matrix	73
3.1.4 Ausblick	75
3.2 CD3-7 <sup>+</sup> Zellen als mögliche NK- und T-Zellvorläufer	75
3.3 Endostatin als aktives Fragment des Kollagen Typ XVIII	77
<b>4 Zusammenfassung</b>	80
<b>5 Literatur</b>	83
<b>6 Danksagung</b>	94
<b>7 Erklärung</b>	95

Der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift liegen folgende 5 Arbeiten zugrunde:

1. Pender SL, Breese EJ, **Günther U**, Howie D, Wathen NC, Schuppan D, MacDonald TT (1998) Suppression of T cell-mediated injury in human gut by interleukin 10: role of matrix metalloproteinases. *Gastroenterology* 115(3): 573-583.
2. **Günther U**, Herbst H, Bauer M, Isbert C, Buhr HJ, Riecken EO, Schuppan D (2001) Collagen type XVIII/endostatin is differentially expressed in primary and metastatic colorectal cancers and ovarian carcinomas. *British Journal of Cancer* 85(10): 1540-1545.
3. Pender SL, Braegger C, **Günther U**, Monteleone G, Meuli M, Schuppan D, MacDonald TT (2003) Matrix metalloproteinases in necrotising enterocolitis. *Pediatric Research* 54(2): 160-164.
4. **Günther U**, Holloway JA, Gordon JN, Knight A, Chance V, Hanley NA, Wilson DI, French R, Spencer J, Steer H, Anderson G, Macdonald TT (2005) Phenotypic characterization of CD3-7+ cells in developing human intestine and an analysis of their ability to differentiate into T cells. *Journal of Immunology* 174(9): 5414-5422.
5. **Günther U**, Bateman AC, Beattie RM, Bauer M, MacDonald TT, Kaskas BA (2010) Connective Tissue Growth Factor expression is increased in collagenous colitis and coeliac disease. *Histopathology* 57(3): 427-435.

## Abkürzungen

C18	Kollagen Typ XVIII
CCN	<u>C</u> ystein rich 61, <u>CT</u> GF, <u>N</u> ephroblastoma Overexpressed Gene
CD	Cluster of Differentiation, immunophänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DSS-Kolitis	durch Dextrannatriumsulfat-induzierte Kolitis
ECM	extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor, epidermaler Wachstumsfaktor
EMT	Epithelial-to-Mesenchymal-Transition
FACIT	Fibrillenassoziierte Kollagene
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, Form der Durchflusszytometrie
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IL	Interleukin
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
ISH	In-situ-Hybridisierung
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMPI	Matrix-Metalloproteinase Inhibitor
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, spezifischer Transkriptionsfaktor
NK	Natural Killer cells, natürliche Killerzellen, NK-Zellen
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PRR	Pattern recognition receptors
PWM	Pokeweed Mitogen, Inhaltsstoff der Kermesbeere
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SEB	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin-B
Smad-Proteine	sma- und mad-verwandte Proteine, Transkriptionsfaktoren
TCR	T cell receptor, T-Zell-Rezeptor
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$ , transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$
Th	T-Helferzellen
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TLR	Toll-like receptor
TNBS-Kolitis	durch "2,4,6-Trinitrobenzen-Sulfonsäure"-induzierte Kolitis
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

# 1 Einleitung

Fibrogenese ist ein entzündungsbedingter physiologischer Vorgang, der zu Wund- und Gewebsheilung oder zur Fibrose führen kann – abhängig vom Verhältnis der Synthese zum Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) (1).

Bei den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) kann es zu einer überschießenden Produktion von aktiven Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) kommen, die nicht mehr durch ihre Inhibitoren, die *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPs), kontrolliert werden können. Dies führt zu einem Abbau oder Umbau der ECM, wodurch schwere Gewebsdestruktionen eintreten können.

Eine Fibrose entsteht, wenn die normale Gewebsarchitektur postinflammatorisch nicht wieder hergestellt werden kann. Bei den CED tritt dieses Phänomen häufig auf. Insbesondere beim M. Crohn entwickeln etwa ein Drittel der Patienten im Krankheitsverlauf durch Fibrose relevante Strikturen oder Obstruktionen (2,3). Antientzündliche Therapien können jedoch nur bedingt die Fibrosebildung beeinflussen und nicht auf bereits bestehende Strikturen einwirken (4). Die Behandlung intestinaler Strikturen erfolgt bislang endoskopisch durch eine Ballondilatation (wonach sich 36% der Patienten innerhalb von fünf Jahren einer Operation unterziehen müssen) (5) oder operativ.

Potentielle Zielstrukturen künftiger antifibrotischer Therapien könnten an der Fibrogenese, Zellproliferation oder Angiogenese beteiligte Faktoren hemmen oder den Abbau der ECM induzieren. Die Entwicklung dieser Therapien wird erschwert durch das noch nicht vollständige Verständnis der zellulären und molekularen Vorgänge des ECM-Stoffwechsels.

Einzelne bereits im Tierversuch und in klinischen Studien getestete Therapieansätze (z.B. selektive MMP-Inhibitoren, MMPIs) haben noch nicht den Einzug in den klinischen Alltag gefunden.

In dieser kumulativen Habilitationsschrift werden Arbeiten zusammengefasst, die die Zusammensetzung der ECM und das Verhältnis von fibrogenetischen und fibrolytischen Faktoren bei verschiedenen entzündlichen Darmerkrankungen untersuchen, um Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapien zu schaffen.

### **1.1 Extrazelluläre Matrix**

Die ECM umgibt als dreidimensionale Substanz die Zellen. Sie ist für die Gewebsarchitektur von Organen nötig, bzw. in Form von Basalmembranen für die Strukturbildung von Zellschichten. Die ECM besteht je nach Gewebstyp aus unterschiedlichen Mengen von Proteoglykanen und Faserproteinen (1). Proteoglykane sind Glykosaminoglykane (Polysaccharide), die an Proteine (Core-Proteine) gekoppelt sind. Die Faserproteine der ECM bestehen aus Strukturproteinen (z.B. verschiedene Kollagene und Elastin) und Adhäsionsproteinen (Glykoproteine, z.B. Laminin, Fibronectin, Vitronectin und Tenascin).

Zur ECM gehören auch die sich in ihr befindenden Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, „aktiven“ Peptide und die Moleküle auf den Zelloberflächen (6,7). Die makromolekularen Proteine der ECM weisen eine hohe negative Ladungsdichte auf und können kleinere geladene Moleküle (wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren) binden. Damit stellt die ECM ein Reservoir für lösliche Faktoren da, die durch die Degradation der ECM freigesetzt werden können. Daneben gibt es auch direkte, spezifische Bindungen von Wachstumsfaktoren an ECM-Proteine. Proteine der ECM können nach Proteolyse als „aktive“ Peptide ihrerseits an Rezeptoren für Wachstumsfaktoren oder Integrine auf den Zelloberflächen binden. So kann die ECM mannigfaltige Interaktionen zwischen den Zellen und zwischen Zellen und anderen Bestandteilen der ECM vermitteln (6,7). Die ECM beeinflusst die Proliferation und Differenzierung der ansässigen und infiltrierenden Zellen, das Überleben oder die Apoptose sowie die Migration der Zellen. Im

entzündeten Gewebe kann die ECM durch mannigfaltige räumlich und zeitlich koordinierte Signale das Verhalten der infiltrierenden Leukozyten beeinflussen (7). Kollagen ist das Hauptprotein der ECM. Bisher sind mindestens 28 verschiedene Kollagene bekannt sowie mindestens zehn weitere Proteine mit kollagenähnlichen Domänen. Die Kollagene werden nach ihrer Struktur in die folgenden Untergruppen aufgeteilt (8):

Fibrilläre Kollagene	Kollagen Typ I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII
Netzbildende Kollagene	Kollagen Typ IV, VI, VIII, X
Fibrillenassoziierte Kollagene (FACIT)	z.B. Kollagen Typ IX, XII, XIV, XXII
Verankerungsfibrillen	Kollagen Typ VII
Kollagene mit Transmembrandomänen	Kollagen Typ XIII, XVII, XXIII, XXV
Endostatin-Vorstufen Kollagene	Kollagen Typ XV, XVIII
Andere Kollagene	Kollagen Typ XXVI, XXVIII

Endostatin ist ein 20 kDa Fragment vom C-terminalen Ende des Kollagen Typ XVIII, das einen sehr potenten Angiogenesehemmer darstellt und in der letzten Arbeit dieser kumulativen Habilitationsschrift untersucht wird.

In der ECM herrscht ein Fließgleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau. Die Synthese der ECM erfolgt u.a. durch Fibroblasten, Myofibroblasten, Makrophagen, Chondroblasten und Osteoblasten, aber auch Epithel- und Endothelzellen können ECM-Moleküle sezernieren.

Für den Matrixabbau sind verschiedene Gruppen von Proteasen verantwortlich: Serin/Threonin-, Cystein-, Aspartat-Proteasen und vor allem MMPs.

## 1.2 Matrix-Metalloproteinasen

1962 wurde erstmals von Jerome Gross und Charles Lapiere über MMPs berichtet (9). MMPs sind neutrale  $Zn^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -enthaltende Endopeptidasen. Bisher sind mehr als 20 verschiedene MMPs charakterisiert worden (10).

Die einzelnen Mitglieder der MMP-Familie besitzen eine unterschiedliche Struktur, Substratspezifität und Funktionen, die zu ihrer Einteilung in acht Gruppen geführt hat (10):

1. Kollagenasen (Typ-I-Kollagenasen)
2. Gelatinasen (Typ-IV-Kollagenasen)
3. Stromelysine
4. Matrilysine
5. membranständige MMPs
6. Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-haltige MMPs
7. MMP-19-artige MMPs
8. nicht klassifizierbare MMPs

MMPs bestehen aus einem Signalpeptid, einer Propeptidregion, einer katalytischen Domäne mit einer hochkonservierten Zink-bindenden Region und zumeist einer Hämapexin-ähnlichen Domäne, die über eine sogenannte Hinge-Region mit der katalytischen Domäne verbunden ist (10,11). Die membranständigen MMPs besitzen am C-terminalen Ende zusätzlich eine Transmembran-Domäne und eine zytoplasmatische Domäne.

Die Aktivität der MMPs kann auf den Ebenen der Transkription, Translation, Sekretion und Enzym-Aktivierung reguliert werden: Die Transkription der MMPs wird durch verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone stimuliert, z.B. durch Interferone, Interleukin (IL)-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -6, Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , den *Epidermal Growth Factor* (EGF), den *Transforming Growth Factor*- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), den *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) (10).



Die MMP-Expression kann auch durch direkten Zell-Zell-Kontakt oder durch Zell-ECM-Interaktionen reguliert werden. Die Aktivierung der sezernierten pro-MMPs kann extrazellulär allosterisch und/oder enzymatisch (z.B. durch bereits aktivierte MMPs, Plasmin oder Trypsin) erfolgen. Die enzymatische Aktivität der MMPs wird spezifisch durch die TIMPs (siehe unten) reguliert und kann unspezifisch durch im Plasma zirkulierende Proteaseinhibitoren (wie z.B.  $\alpha$ 2-Makroglobulin und  $\alpha$ 1-Antiprotease) gehemmt werden.

MMPs spalten die Strukturproteine der ECM sowie Nicht-Strukturproteine (wie Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle) und sind an Zell-Zell- und Zell-ECM-Interaktionen involviert. MMPs sind daher als Proteasen am Stoffwechsel der ECM beteiligt, können aber über die Regulation der Aktivität und Bioverfügbarkeit von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren die Migration von Entzündungszellen aus den Gefäßen ins Gewebe beeinflussen und inflammatorische Prozesse modulieren (6,7,10).

### **1.3 Tissue Inhibitors of Metalloproteinases**

Die Aktivität der MMPs kann durch spezifische Inhibitoren, die TIMPs, verändert werden, die kompetitiv und reversibel die Aktivität der MMPs hemmen (10). Es wurden bisher vier TIMPs identifiziert (TIMP-1, -2, -3, -4), die strukturelle Homologien besitzen. TIMPs bestehen aus zwei Domänen, einer N-terminalen Domäne aus ca. 125 Aminosäuren und einer C-terminalen Domäne mit ca. 65 Aminosäuren. Die N-terminale Domäne interagiert mit dem  $Zn^{2+}$  der katalytischen Domäne der MMPs in einer 1:1 Stöchiometrie und hemmt dadurch die MMPs. Die TIMPs hemmen die Aktivität aller MMPs. Die einzelnen TIMPs haben aber unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen MMPs. TIMP-1 und TIMP-3 reagieren

vorzugsweise mit MMP-9, TIMP-2 mit MMP-2. Insgesamt ist das Verhältnis MMP/TIMP ein wichtiger Faktor für die Kontrolle der proteolytischen Aktivität in der ECM.

TIMP-1 hemmt nicht nur den ECM-Abbau durch die MMPs, es stimuliert auch den Zellwachstum bestimmter Zellarten und scheint an der Suppression von Apoptose in bestimmten Geweben beteiligt zu sein. Es wird durch viele verschiedene Zellen wie Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Hepatozyten und hepatische Sternzellen gebildet. Neben den natürlich vorkommenden TIMPs wurde bereits eine Vielzahl an synthetischen Inhibitoren der MMPs entwickelt (12). Die peptid-basierten MMPIs wie Batimastat oder Marimastat wurden bereits in vielen präklinischen Studien getestet (13); problematisch waren jedoch die unselektive MMP-Hemmung, die niedrige orale Bioverfügbarkeit und das ungünstige Nebenwirkungsprofil (12). Aktuell befinden sich mehrere nicht peptid-basierte sowie selektivere MMPIs in der Entwicklung (12).

#### **1.4 Zelluläre und molekulare Modulation der extrazellulären Matrix**

Hauptquelle der ECM-Synthese sind aktivierte Myofibroblasten, die sich im Darm aus mesenchymalen Zellen (Fibroblasten, subepithelialen Myofibroblasten, glatten Muskelzellen), Epithel- und Endothelzellen entwickeln können (Abb. 1). Insbesondere die Umwandlung von Epithelzellen zu Myofibroblasten (sog. Epithelial-to-Mesenchymal-Transition, EMT) scheint bei den CED eine wichtige Rolle zu spielen und wird durch TGF- $\beta$  und IL-13 induziert (14-16). Die Aktivierung der Myofibroblasten erfolgt über autokrine und parakrine Wege und über sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), nach Kontakt von Mikroorganismen mit *pattern recognition receptors* (PRRs) wie den *toll-like receptors* (TLRs) oder dem *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2* (NOD2). Myofibroblasten können auch durch Zell- und ECM-Fragmente über sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) aktiviert werden (2).

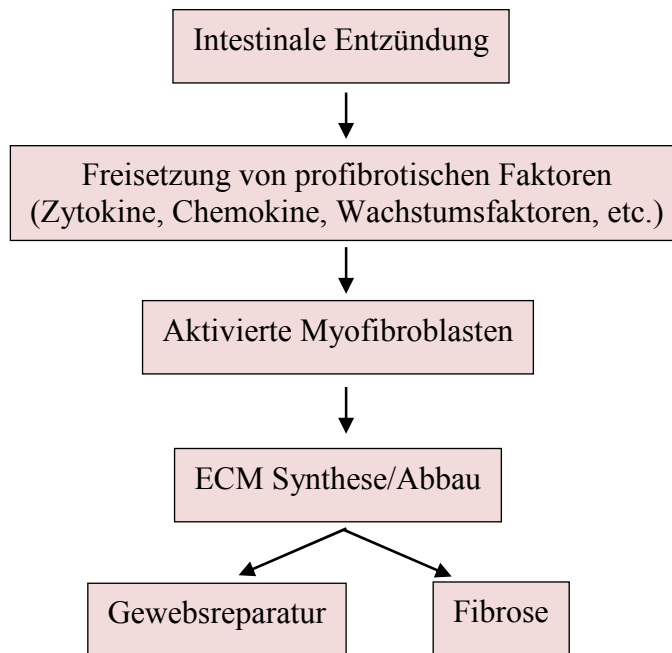


Abb. 1 Pathogenese der intestinalen Entzündung und Fibrose, modifiziert nach Latella *et al.* (17)

Die Aktivierung der Myofibroblasten und der ECM-Synthese wird durch viele verschiedene Faktoren reguliert. Der wichtigste bereits bekannte profibrotische Signalübertragungsweg ist die TGF- $\beta$ /Smad- Kaskade (Abb. 2). TGF- $\beta$ 1 bindet an die transmembranösen TGF- $\beta$ -Rezeptoren, wodurch es zur Phosphorylisierung der Rezeptor-assoziierten Smad-Proteine kommt, die als Transkriptionsfaktoren das TGF- $\beta$ 1 Signal modifizieren und verstärken (18,19).

*Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) gehört zur CCN (Cystein rich 61, CTGF, Nephroblastoma Overexpressed Gene)-Familie und ist ein weiterer profibrotischer Faktor, dessen Genexpression durch TGF- $\beta$ 1 heraufreguliert wird (aber auch TGF- $\beta$ 1 unabhängig reguliert werden kann). Als Folge kommt es zur Proliferation von Kollagen-produzierenden Myofibroblasten, zur erhöhten Kollagensekretion, zur verminderten MMP-1- und erhöhten TIMP-1-Synthese (20,21). Der TGF- $\beta$ /Smad-Signalübertragungsweg kann durch

verschiedenste pro- und antifibrotische Faktoren beeinflusst werden, die hier im Einzelnen nicht weiter aufgeführt werden (Abb. 2).

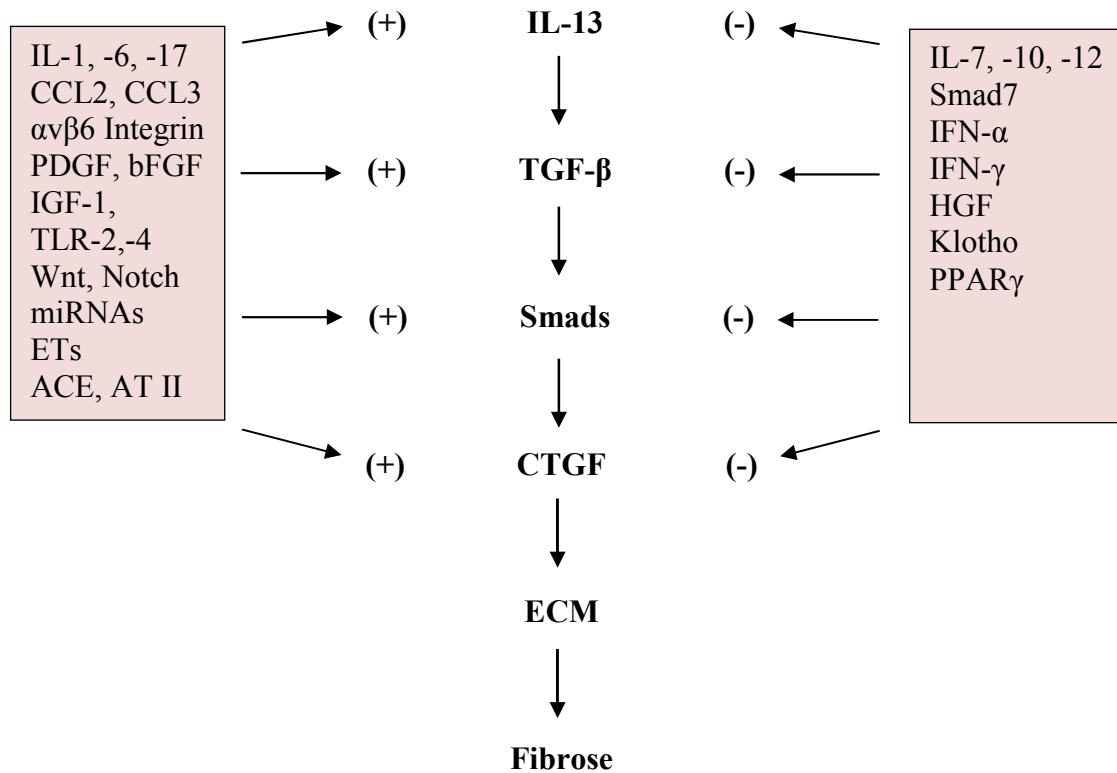


Abb. 2 TGF-β/Smad-Signalübertragungsweg und modulierende pro- und antifibrotische Faktoren, modifiziert nach Latella *et al.* (17). CCL2= monocyte chemoattractant protein-1, CCL3= macrophage inflammatory protein-1, bFGF= basic fibroblast growth factor, IGF-1=insulin-like growth factor I, Wnt, ET= endothelins, ACE= angiotensin converting enzyme, AT II= angiotensin II, mTOR= mammalian target of rapamycin, HGF=hepatic growth factor, Klotho=Klotho family of membrane proteins, PPARγ= peroxisome proliferator activator-γ

Die Signalkaskade bietet Ansatzpunkte für antifibrotische Therapiemöglichkeiten. Im Mausmodell führte allerdings die Blockierung von TGF-β1 zur T-Zellaktivierung und schweren intestinalen Entzündungen (22-24). Die Inhibierung einzelner Smad-Proteine war von einer gestörten T-Zellentwicklung und Autoimmunphänomenen gefolgt (25), sodass die Blockierung einzelner die Kaskade modulierender Faktoren zu einer selektiveren Hemmung führen könnte.

## **1.5 Genetische Faktoren, intestinale Mikrobiota und Fibrose**

In genomweiten Assoziationsstudien wurden bis heute mehr als 160 genetische Regionen und Gene identifiziert, die ursächlich mit der Genese der CED in Verbindung gebracht werden (26) und die u.a. die intestinale Barrierefunktion, NOD2 und andere Faktoren der angeborenen sowie adaptiven Immunantwort betreffen (27). Die bakterielle Darmflora, die sogenannte intestinale Mikrobiota, die in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung getreten ist, scheint eine wichtige Rolle bei Entzündungs- und Fibrosevorgängen zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass eine veränderte Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota bei Patienten mit CED besteht (28,29). In nahezu allen murinen CED-Modellen konnte unter keimfreien Bedingungen eine abgemilderte oder fehlende Entzündung beobachtet werden bzw. nach Antibiotikagabe eine verminderte Kolitis (30).

In experimentellen Systemen konnte interessanterweise demonstriert werden, dass der Transfer der Darmflora in eine andere Maus zur phänotypischen Veränderung bei dieser führen kann. So führte die Stuhltransplantation aus dicken Mäusen in keimfreie dünne Mäuse zu einer Gewichtszunahme bei letzteren (31). Ferner konnte gezeigt werden, dass eine Darmentzündung nur durch den Transfer von Mikrobiota von kranken auf gesunde Mäuse übertragen werden kann (32). Denkbar wäre im Umkehrschluss, dass der Transfer von intestinaler Mikrobiota eines gesunden Spenders eine zukünftige Behandlungsmöglichkeit für Patienten mit CED darstellen könnte. In einer kürzlich publizierten Studie konnte mit dieser Behandlungsmethode eine schnellere Remissionsinduktion bei Patienten mit Colitis ulcerosa erreicht werden (33). Eine weitere Studie konnte diesen Effekt allerdings nicht nachweisen (34).

Die Rolle der intestinalen Mikrobiota bei der Fibrosebildung ist bisher noch weniger erforscht. Allerdings konnte in einem Mausmodell mit Crohn-artiger Ileitis (SAMP1/YitFc) gezeigt werden, dass es unter keimfreien Bedingungen zu einer verminderten Fibrosebildung kommt (35).

## 1.6 Vorgänge in der extrazellulären Matrix bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Bei den CED M. Crohn und Colitis ulcerosa ist die Ätiologie und Pathogenese noch nicht gänzlich geklärt. Vermutlich scheint bei genetischer Prädisposition ein gestörtes Verhältnis zwischen mukosaler Barrierefunktion (und der angeborenen Immunität), dem intestinalem Mikrobiom und der adaptiven Immunität vorzuliegen (30,36). Das Immunsystem besteht aus der angeborenen (unspezifischen) und der adaptiven (spezifischen) Immunität. In der Mukosa treffen bakterielle und andere Pathogene u.a. auf neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, *Natural Killer* (NK)-Zellen, die deren PAMPs über PRRs erkennen und zytotoxische und phagozytotische Aktivitäten entwickeln können (im Rahmen der angeborenen Immunantwort). Im Rahmen der adaptiven Immunantwort kommt es zu einer Aktivierung der T-Zellen in der Lamina propria. Bei den CED liegt ein Ungleichgewicht zwischen regulatorischen T-Zellen und proinflammatorischen T-Zellen vor (36). Nach T-Zellaktivierung finden sich bei beiden Erkrankungen im Gewebe ein proinflammatorisches Zytokinmilieu (mit TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-23), es kommt in beiden Entitäten zur chronischen Entzündung.

Bei der Colitis ulcerosa erstreckt sich die Entzündung eher oberflächlich auf die Mukosa und Submukosa, während sich beim M. Crohn eine transmurale, granulomatöse Entzündung findet. Im entzündeten Gewebe differenzieren unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  und IL-13 lokal ansässige mesenchymale Zellen und Epithelzellen zu aktiven Myofibroblasten (16), die nach Stimulation große Mengen an MMPs und ECM produzieren. So wurden erhöhte MMP-Spiegel in Homogenisaten aus entzündetem Darmgewebe von CED-Patienten nachgewiesen. In verschiedenen Kolutismodellen und bei der humanen CED sind zahlreiche MMPs (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -12, -13, -14) erhöht exprimiert (37-48). Bei der Colitis ulcerosa und beim M. Crohn korrelierte die Expression von MMP-3 bzw. MMP-9 mit dem Schweregrad der Entzündung (39,40), die Expression von MMP-1, -3 und -13 mit dem Auftreten von

Ulzerationen (41,43,47). Das Verhältnis von MMP-1 bzw. MMP-3 zu TIMP-1 ist erhöht im entzündeten Kolon von CED-Patienten im Vergleich zum normalen Kolongewebe (44,48), wohingegen der TIMP-2 RNA-Gehalt nicht verändert ist (44). Bei der durch Dextrannatriumsulfat (DSS)-induzierten Kolitis führte die Inhibition von MMP-2 zu einem abgemilderten Krankheitsverlauf (49). Bei Patienten mit Colitis ulcerosa, stattgehabter Proktokolektomie und Pouchitis fanden sich erhöhte MMP-1 und -2 RNA- und Proteinkonzentrationen im Pouchgewebe. Nach sechswöchiger Behandlung mit Metronidazol konnte eine signifikante Abnahme der MMP-1 und -2 Proteinkonzentrationen in der Pouchmukosa und eine Besserung der klinischen Symptome nachgewiesen werden (42).

Bei beiden Erkrankungen kann es als Folge der chronischen Entzündung neben der Gewebsdestruktion auch zur Fibrose kommen: bei der Colitis ulcerosa zu einem „Fahrradschlauch-artigen“ steifen Kolon, beim M. Crohn zu fibrotischen Stenosen und Fistelbildung.

Der TGF- $\beta$ /Smad-Signalübertragungsweg (siehe oben) spielt eine zentrale Rolle bei der Fibrogenese. Bei der Colitis ulcerosa und beim M. Crohn wird TGF- $\beta$ 1 vermehrt produziert, kann aber aufgrund der Inhibition durch Smad7 zumindest phasenweise die Smad-Kaskade nicht aktivieren (50). CTGF, als Teil der Kaskade, wird - wahrscheinlich TGF- $\beta$  unabhängig - hochreguliert. Als Folge kommt es zur Proliferation von Kollagen-produzierenden Myofibroblasten, zur erhöhten Kollagensekretion, zur verminderten MMP-1- und erhöhten TIMP-1-Synthese (20,21). Isolierte Myofibroblasten aus der Mukosa von Crohn-Strikturen zeigen eine höhere TGF- $\beta$ 1-Expression, eine vermehrte Kollagenproduktion, eine verminderte Migrationsfähigkeit und eine höhere TIMP-1-Produktion als Myofibroblasten aus der Mukosa nicht-fibrotischen Darms (51). Dammeier *et al.* (52) konnten eine erhöhte CTGF-Expression bei CED feststellen - in entzündeten Arealen (bei Colitis ulcerosa und Crohn-Kolitis), aber auch in Arealen mit starker Fibrose und wenig Entzündung (bei Crohn-Kolitis). Ferner konnte eine erhöhte CTGF-Expression bei aus Crohn-Strikturen isolierten Myofibroblasten gezeigt

werden (53). IL-13 als profibrotisches Zytokin und Teil der TGF- $\beta$ 1/CTGF-Achse scheint eine wichtige Rolle zu spielen. IL-13-bildende Lymphozyten finden sich vermehrt in Strikturen bei Crohn-Patienten (54). IL-13 mindert die Expression von MMP-1, -2 und -9 bei kultivierten Fibroblasten aus intestinalem Muskelgewebe bei Crohn-Patienten (54).

Smad7 wird beim M. Crohn erhöht exprimiert. Es hemmt die Aktivität des TGF- $\beta$ 1 durch intrazelluläre Bindung an den TGF- $\beta$  Rezeptor (50). Mongersen, ein oral einzunehmender Inhibitor von Smad7, zeigte in einer kürzlich publizierte Plazebo-kontrollierten Phase-II-Studie bei Patienten mit aktivem M. Crohn eine schnellere Remissionsinduktion (55). Welche Auswirkungen die Inhibition von Smad7 auf die Fibrosebildung bei CED hat, ist allerdings noch nicht geklärt. Neuere Arbeiten befassen sich mit dem lokal im Gastrointestinaltrakt ansässigen Renin-Angiotensin-System und insbesondere mit Angiotensin II, das ebenfalls die TGF- $\beta$ 1/CTGF-Achse moduliert. Bei Patienten mit Crohn-Kolitis wurden erhöhte Angiotensin II-Spiegel in der Kolonmukosa nachgewiesen (56). Bei der TNBS-Kolitis führte die orale Administration von Losartan zu einer deutlich verminderten Fibrosebildung und verminderten mukosalen TGF- $\beta$ -Spiegeln (57).

### **1.7 Fragestellung**

Zu den CED gehören auch die beiden selteneren mikroskopischen Kolitiden, die kollagene Kolitis und die lymphozytäre Kolitis. Bei beiden Entitäten und auch bei der nekrotischen Enterokolitis (NEC), die zumeist Frühgeborene betrifft, waren die entzündungsbedingten Vorgänge in der ECM bis dato weitestgehend unbekannt und führten zu den ersten Arbeiten dieser kumulativen Habilitationsschrift. Es stellte sich die Frage, wie sich die ECM dieser Entitäten zusammensetzt und wie sich das Verhältnis von Fibrogenese zur Fibrolyse in der jeweiligen ECM darstellt. Ferner sollte die bis dato ebenfalls wenig bekannte Wirkung von IL-10 auf die MMP-Expression im Darm untersucht werden mit der Frage, ob Gewebsdestruktionen durch IL-10 vermindert werden können.



## 2 Ergebnisse

### 2.1 Matrix Metalloproteinases in Necrotising Enterocolitis.

Pender SL, Braegger C, Günther U, Monteleone G, Meuli M, Schuppan D, MacDonald TT. *Pediatr Res* 2003;54:160-164. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000072326.23442.C3>

Die NEC ist eine entzündliche Darmerkrankung, die zumeist Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht <1500 g betrifft und in den ersten Lebenswochen auftritt. Klinische Symptome variieren von leichten gastrointestinalen Beschwerden mit Diarrhöen bis hin zur intestinalen Ischämie, Darmperforation, Sepsis und Schock. Betroffen sind meistens das terminale Ileum, Zökum und Colon ascendens. Es kann aber jedes Segment des Gastrointestinaltrakts involviert sein.

Die Genese der NEC ist bisher noch unklar und scheint multifaktoriell zu sein. Pränatale Risikofaktoren sind eine Chorioamnionitis und mütterliche Antibiotikaeinnahmen. Als postnatale Risikofaktoren gelten neben dem Frühgeborenenstatus die künstliche enterale Ernährung, eine gestörte oder veränderte bakterielle Besiedlung des neonatalen Darms sowie Infektionen (58). Bei der NEC kommt es zu einer überschießenden Entzündungsreaktion, die zu ischämisch bedingten Nekrosen des Darmgewebes führt. Histologisch zeigen sich intramurale Blutungen, transmurale „bandförmige“ Nekrosen mit einer exzessiven Infiltration von Neutrophilen (59).

In der Arbeit *Matrix Metalloproteinases in Necrotising Enterocolitis* wurde immunhistochemisch die Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrats im Darmgewebe von Neugeborenen mit NEC (im Vergleich zu reseziertem Gewebe bei Neugeborenen mit Darmverschluss) untersucht. Mittels quantitativer RT-PCR wurde der TNF- $\alpha$ -, IFN- $\gamma$ -, MMP- und TIMP-mRNA-Gehalt bestimmt und mittels Western Blot-Analyse die MMP- und TIMP-Proteinexpression. Des Weiteren wurde mittels Doppelmarkierung (immunhistochemische

Färbungen mit Antikörpern gegen CD3, glattmuskuläres  $\alpha$ -Aktin, neutrophile Elastase und CD68 gefolgt von In-situ-Hybridisierung, ISH) die MMP-exprimierenden Zellen im Gewebe identifiziert.

Wir konnten eine im Vergleich zum Kontrollgewebe erhöhte Anzahl von Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen in der Mukosa und Submukosa bei der NEC nachweisen. Es zeigte sich eine erhöhte TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression bei der NEC sowie eine erhöhte mRNA- und Protein-Expression von MMP-3 und TIMP-1, nicht aber von MMP-1, -2, -9 oder TIMP-2. Mittels Doppelmarkierungen konnten die MMP-3-exprimierenden Zellen als  $\alpha$ -Aktin-positive Myofibroblasten identifiziert werden, die sich insbesondere in der Submukosa und an der Grenze zwischen Submukosa und Muskularis befinden.

Die MMP-3, als ECM-degradierende Protease, scheint somit wesentlich beteiligt zu sein an der ausgedehnten Gewebsdestruktion bei der NEC.











## **2.2 Connective tissue growth factor expression is increased in collagenous colitis and coeliac disease.**

Günther U, Bateman AC, Beattie RM, Bauer M, MacDonald TT, Kaskas BA. Histopathology 2010;57:427-435. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03652.x>

Die kollagene Kolitis gehört – zusammen mit der lymphozytären Kolitis – zur Gruppe der mikroskopischen Kolitiden. Erstmals wurde diese Erkrankung 1976 durch Lindström beschrieben (60). Epidemiologische Studien der letzten Jahre konnten zeigen, dass die Inzidenz der mikroskopischen Kolitiden nach einem initialen Anstieg in den 80iger und 90iger Jahren aktuell eher gleichbleibend stabil ist und fast so hoch wie die der CED ist (61-64). Die Genese der kollagenen Kolitis ist bisher noch unklar. Es gibt einzelne Berichte über familiär auftretende mikroskopische Kolitisformen (65,66). Ferner konnte eine Assoziation mit HLA-DQ2 oder HLA-DQ1/3 bzw. mit dem HLA-DR3DQ2 Haplotyp in einzelnen Studien gezeigt werden (67-69). Angeschuldigt werden Autoimmunphänomene, eine medikamenten-induzierte Genese (z.B. durch Aspirin, Nicht-steroidale Antiphlogistika oder Lansoprazol) oder eine infektiöse Genese. Experimentell konnte eine signifikante Dysfunktion der epithelialen Barriere der Kolonschleimhaut aufgezeigt werden (70,71). Als Mechanismus der Diarrhöen scheint eine osmotische und eine sekretorische Komponente vorzuliegen, da in Versuchen mit der Ussing-Kammer neben einer verminderten  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Absorption eine aktive Chlorid-Sekretion nachgewiesen wurde (70) und Fasten zu einer deutlichen Abnahme der Diarrhöen führt (72).

Oft ist die kollagene Kolitis auch mit anderen Autoimmunerkrankungen vergesellschaftet (wie z.B. Autoimmunthyreoiditiden, Zöliakie, Diabetes mellitus oder der rheumatoiden Arthritis) (73). Klinische Symptome sind chronisch-wässrige Diarrhöen, abdominelle Schmerzen und ein leichter Gewichtsverlust. Endoskopisch zeigt sich im Kolon in der Regel eine unauffällige Schleimhaut. Die Diagnose wird anhand der histopathologischen Untersuchung der Biopsien gestellt. Histologisch imponiert bei der kollagenen Kolitis eine breite ECM-Schicht ( $>10 \mu\text{m}$ ) unterhalb des Oberflächenepithels, die eingeschlossene



Kapillaren und Entzündungszellen beinhalten kann. Zusätzlich finden sich lymphoplasmazytäre Infiltrationen in der Lamina propria, vermehrte intraepitheliale Lymphozyten (IELs) und epitheliale Läsionen (73).

In einer vorherigen Arbeit (74) hatten wir die Zusammensetzung der ECM-Schicht charakterisiert und gezeigt, dass sich diese hauptsächlich aus Kollagen Typ I, III und VI und dem extrazellulären Glykoprotein Tenascin aufbaut, und als eine noch unreife, nur locker miteinander verbundene Kollagenschicht erscheint, die einem schnellen Abbau unterliegen kann. Mittels radioaktiver ISH hatten wir nachgewiesen, dass eine erhöhte mRNA-Expression von Prokollagen  $\alpha 1(I)$ ,  $\alpha 1(IV)$  und TIMP-1 durch  $\alpha$ -Aktin-positive Zellen (i.S. der subepithelialen Myofibroblasten) unterhalb der ECM-Schicht in linearer Verteilung vorliegt – bei nur punktuell leicht erhöhter MMP-1-mRNA-Expression, was auf ein Ungleichgewicht zwischen Fibrogenese und Fibrolyse zugunsten der Fibrogenese hinweist.

In der Arbeit *Connective tissue growth factor expression is increased in collagenous colitis and coeliac disease* wurde mittels radioaktiver ISH die mRNA-Expression des profibrotischen Faktors CTGF an paraffinisiertem Biopsiematerial von Patienten mit kollagener Kolitis, lymphozytärer Kolitis, noch unbehandelter Zöliakie und normalen Kolon- und Duodenalbiopsien als Kontrollgewebe untersucht. Bei der Zöliakie wurde die CTGF-Expression zusätzlich mittels quantitativer RT-PCR von kryokonservierten Gewebeproben bestimmt.

Wir konnten eine signifikant erhöhte CTGF-mRNA-Expression bei der kollagenen Kolitis nachweisen, die sich in Co-Lokalisation mit der Prokollagen  $\alpha 1(I)$ -Expression in den subepithelialen Myofibroblasten unterhalb der ECM-Schicht fand. Bei der lymphozytären Kolitis, bei der es zu keiner erhöhten ECM-Ablagerung in der subepithelialen Region kommt, zeigte sich keine erhöhte CTGF-Expression. Bei der Zöliakie konnte mittels ISH und RT-PCR ebenfalls eine erhöhte CTGF-Expression im subepithelialen Bereich nachgewiesen werden.

Die lokal erhöhte CTGF-Expression unterhalb der verbreiterten ECM-Schicht bei der kollagenen Kolitis stellt einen attraktiven Ansatzpunkt für zukünftige antifibrotische Therapien dar.





















### **2.3 Suppression of T Cell-mediated Injury in Human Gut by Interleukin 10: Role of Matrix Metalloproteinases.**

Pender SL, Breese EJ, Günther U, Howie D, Wathen NC, Schuppan D, MacDonald TT. *Gastroenterology* 1998;115:573-583.

IL-10 wird von aktivierten Makrophagen und regulatorischen T-Zellen produziert. Es hemmt die Aktivierung von Th1-Zellen gegen luminale bakterielle Antigene (75), induziert orale Toleranz (76) und spielt so eine wichtige Rolle bei der Entzündungsmodulation in der Mukosa.

Humane fetale Dünndarm Explantationskulturen stellen ein experimentelles Enteropathiesystem dar, bei dem die Lamina propria T-Zellen direkt durch Mitogene oder Superantigene aktiviert werden können (77-79). Pokeweed Mitogen (PWM) aktiviert nahezu alle mukosalen T-Zellen und führt zur erhöhten MMP-Synthese und Mukosadestruktion (37,80). *Staphylococcus aureus* Enterotoxin-B (SEB) aktiviert spezifische mukosale T-Zellen und führt zur Zottenatrophie und Krypthyperplasie.

In der Arbeit *Suppression of T Cell-Mediated Injury in Human Gut by Interleukin 10: Role of Matrix Metalloproteinases* sollte die bis dahin noch wenig bekannte Wirkung von IL-10 auf die MMP-Expression in beiden experimentellen Enteropathiesystemen untersucht werden. Beide Enteropathiesysteme wurden ohne und nach Zugabe von rekombinanten IL-10 histologisch und immunhistochemisch mit CD3-, CD25- und Cytokeratin-Antikörpern charakterisiert. Die Anzahl der Zytokin-produzierenden Zellen (in An- oder Abwesenheit von IL-10) und die IFN- $\gamma$ -Synthese wurden gemessen. MMPs (MMP-1, -2, -3, -9) und TIMP-1 wurden in den Überständen beider Systeme mittels Western Blot-Analyse bestimmt und der Anteil an latenten und aktivierten MMPs mittels Western Blot und Zymographie definiert. In beiden Explantationssystemen zeigte sich eine Mukosadestruktion (ausgeprägter bei PWM als bei SEB). In beiden Explantationssystemen wurde die nach T-Zellaktivierung erhöhte Anzahl an Zytokin-sezernierenden Zellen und die IFN- $\gamma$ -Produktion durch IL-10 gehemmt. Ferner

hemmte IL-10 dosisabhängig die Synthese von MMP-1, MMP-3 und TIMP-1. In Kontroll-Dünndarm Explantationskulturen verminderte IL-10 die MMP-Synthese (MMP-1, -2, -3, -9). IL-10 hemmt die mukosale T-Zellaktivierung und die Synthese von MMPs und mindert somit den MMP-vermittelten ECM-Abbau bzw. die Gewebsdestruktionen im Darm.



























## **2.4 Phenotypic Characterization of CD3-7<sup>+</sup> Cells in Developing Human Intestine and an Analysis of Their Ability to Differentiate into T Cells.**

Günther U, Holloway JA, Gordon JN, Knight A, Chance V, Hanley NA, Wilson DI, French R, Spencer J, Steer H, Anderson G, Macdonald TT. J Immunol 2005;174:5414-5422. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5414>

Die T-Zellentwicklung findet im Thymus statt. CD7<sup>+</sup> T- und NK-Vorläuferzellen werden ab der fünften Schwangerschaftswoche post conceptionem (p.c.) in der fetalen Leber und im Knochenmark gefunden. Ab der 7.-8. Woche wird der humane Thymus von CD7<sup>+</sup> Zellen besiedelt, die dann die T-Zellreifung und -differenzierung dort durchlaufen. Ab der 9.-10. Woche können im fetalen Darm CD3<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden, deren Zahl stetig zunimmt und um die 20. Woche etwa 1/3 der postnatalen T-Zelldichte erreicht. Im humanen fetalen Darm wurde eine CD3-7<sup>+</sup> Zellpopulation beschrieben (81), die möglicherweise direkt von den hämatopoetischen Zentren, der fetalen Leber und dem Knochenmark, abstammt und thymusunabhängig eine T-Zelldifferenzierung im Darm durchlaufen konnte.

In der Arbeit *Phenotypic Characterization of CD3-7<sup>+</sup> Cells in Developing Human Intestine and an Analysis of Their Ability to Differentiate into T Cells* sollte die CD3-7<sup>+</sup> Zellpopulation im humanen fetalen Darm mittels FACS-Analysen charakterisiert und ihre Fähigkeit untersucht werden, sich extrathymisch in CD3<sup>+</sup> T-Zellen zu differenzieren. Die Mehrheit der CD3-7<sup>+</sup> Zellen zeigte keine CD4- oder CD8-Expression. Ein Großteil der Population exprimierte die NK-Marker CD56, CD94 und CD161, wohingegen CD3<sup>+</sup> Zellen zwar eine CD161-Expression aufwiesen, aber nur selten CD56- oder CD94-Expression. Etwa die Hälfte der CD3-7<sup>+</sup> Zellpopulation zeigte intrazellulär CD3ε. Nach Zellisolierung wurde durch zweimaliges FACSSorten eine (>99% reine) CD3-7<sup>+</sup> und eine CD3<sup>+</sup>7<sup>+</sup>-Population erhalten und eine PCR für die T-Zell-Rezeptor (TCR)-γ-Kettenrekombination durchgeführt. In der CD3-7<sup>+</sup> Population konnten rekombinierte TCR-γ-Ketten nachgewiesen werden – als frühes Zeichen der T-Zelldifferenzierung. In ein murines Thymusorgankultursystem wurden

gereinigte CD3-7<sup>+</sup> Zellen eingebracht; nach 14 Tagen zeigten ca. 30% der Zellen eine CD3-Expression auf ihrer Oberfläche. Die CD3-7<sup>+</sup> Zellpopulation im fetalen Darm weist somit ein NK-Marker-Profil auf. Eine Subpopulation der CD3-7<sup>+</sup> Zellen kann zu CD3<sup>+</sup> T-Zellen heranreifen, sodass diese Zellen im heranwachsenden Darm möglicherweise extrathymisch eine T-Zelldifferenzierung durchlaufen.





















## **2.5 Collagen type XVIII/endostatin is differentially expressed in primary and metastatic colorectal cancers and ovarian carcinomas.**

Guenther U, Herbst H, Bauer M, Isbert C, Buhr HJ, Riecken EO, Schuppan D.  
Br J Cancer 2001;85:1540-1545.

C18 ist – wie bereits in der Einleitung erwähnt - ein nicht-fibrilläres Kollagen und Proteoglykan der Basalmembranen. Sein 20 kDa C-terminales Fragment, das Endostatin, gilt als potenter endogener Angiogeneseinhibitor (82). C18 wird vor allem durch Hepatozyten synthetisiert – sowohl in normaler, als auch in zirrhotischer Leber oder im hepatozellulären Karzinom (83,84). Die starke C18-Expression durch hepatozelluläre Tumorzellen lässt vermuten, dass C18 nicht nur eine wichtige Rolle bei der Bildung von Basalmembranen einnimmt, sondern auch bei der Regulation der Angiogenese und folglich des Tumorwachstums.

In der Arbeit *Collagen type XVIII/endostatin is differentially expressed in primary and metastatic colorectal cancers and ovarian carcinomas* wurde die C18-Expression bei kolorektalen Karzinomen und ihren Lebermetastasen – als häufigste sekundäre Lebertumoren – und bei primären Ovarialkarzinomen – als histologisch oftmals schwer von Kolonkarzinomen bzw. deren Metastasen unterscheidbarer Entität – untersucht. Die C18-mRNA-Expression wurde mittels radioaktiver ISH, die C18-Proteinexpression durch immunhistochemische Färbungen bestimmt. Mittels Doppelmarkierungen (immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Cytokeratin, Vimentin, dem glattmuskulären  $\alpha$ -Aktin und dem Endothelmarker CD31 gefolgt von ISH) wurden die C18-exprimierenden Zellen charakterisiert. Bei den Kolonkarzinomen und deren Lebermetastasen fand sich eine starke C18-Expression in den Endothelzellen, Fibro- und Myofibroblasten – nicht jedoch in den Karzinomzellen. Bei den Ovarialkarzinomen dagegen zeigten sowohl die Karzinomzellen, als auch die Stromazellen eine hohe C18-Expression. Die C18-Expression des Tumorstromas scheint somit unabhängig reguliert zu sein von der C18-Expression der

Karzinomzellen. Die lokale Synthese des C18 durch Tumorzellen und das Tumorstroma könnte zukünftig die Möglichkeit eröffnen, durch die Induktion einer der Endostatin-freisetzenden Proteasen, das Tumorwachstum zu unterdrücken.















## **3 Diskussion**

### **3.1 Intestinale Entzündungen mit und ohne Fibrosebildung**

Unter physiologischen Bedingungen sind MMPs in geringen Konzentrationen verantwortlich für den normalen Umbau der ECM. Bei entzündlichen Prozessen stimulieren aus T-Zellen und anderen infiltrierten Zellen freigesetzte Zytokine (insbesondere TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1) die Expression der ECM-Komponenten (Kollagene, MMPs, TIMPs etc.) (6,7). Dabei können je nach Entzündungsprozess größere Mengen von aktivierten MMPs, die nicht mehr durch TIMPs inhibiert werden können, zu Gewebsdestruktionen führen oder bei einem Überwiegen der Fibrogenese vermehrte ECM-Ablagerungen auftreten.

#### **3.1.1 Vorgänge in der extrazellulären Matrix bei der nekrotisierenden Enterokolitis**

Bei der NEC liegt eine Entzündung mit ischämisch bedingten Koagulationsnekrosen vor, hier steht der Gewebsuntergang, die Fibrolyse im Vordergrund. Der ECM-Stoffwechsel bei der NEC ist bisher noch wenig untersucht worden. Die Erkrankung betrifft fast ausschließlich Frühgeborene und geht mit einer Mortalität von 15-30% einher (58).

Eine frühzeitige künstliche enterale Ernährung, die bakterielle Besiedlung des Gastrointestinaltrakts und Infektionen scheinen Risikofaktoren zu sein. Die intestinale Barriere ist beim Frühgeborenen noch nicht ausgereift. Die intestinale Motilität entwickelt sich erst im 3. Trimester (85), dadurch ist das intestinale Epithel länger schädlichen Noxen ausgesetzt. Der intestinale Mucus – als unspezifischer Schutzwall – und die Tight Junctions sind noch nicht ausgereift, was zu einer erhöhten intestinalen Permeabilität und verminderten Regenerationsfähigkeit des Epithels führt. In den noch nicht ausgereiften, intestinalen Epithelzellen scheint die Expression von TLR-2 und -4 und einzelner Transkriptionsfaktoren des NF- $\kappa$ B-Signalweges hochreguliert zu sein (86), sodass es nach Kontakt mit der

intestinalen Mikrobiota zu einer überschießenden Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) kommt (58,86), gefolgt von einer ausgeprägten Entzündung. Endotheliale Dysregulation und überschießende Vasokonstriktion im Gewebe führen zu ischämisch bedingten Nekrosen des Darmgewebes (87). Histologisch zeigen sich intramurale Blutungen, transmurale, „bandförmige“ Nekrosen mit einer exzessiven Infiltration von Neutrophilen (59). Wir konnten ebenfalls eine erhöhte Anzahl von Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen in der Mukosa und Submukosa bei der NEC nachweisen und fanden eine erhöhte MMP-3- und TIMP-1-Expression. Mittels Doppelmarkierungen (immunhistochemische Färbung gefolgt von ISH) konnten die MMP-3-exprimierenden Zellen als  $\alpha$ -Aktin-positive Myofibroblasten detektiert werden, die sich insbesondere in der Submukosa und an der Grenze zwischen Submukosa und Muskularis befinden. Die erhöhte MMP-3-Expression und Sekretion scheint am ehesten durch TNF- $\alpha$  vermittelt zu sein, das ebenfalls bei der NEC erhöht exprimiert wird. Bister *et al.* konnten ferner eine erhöhte MMP-7-, -12- und -26-Expression bei der NEC nachweisen (88). Somit scheinen mehrere MMPs an der ausgedehnten Gewebsdestruktion bei der NEC beteiligt zu sein. Bei der DSS-induzierten Kolitis sind vor allem die Stromelysine (MMP-3 und -10) für den Gewebsabbau verantwortlich (89); diese Funktion könnten sie bei der NEC ebenfalls einnehmen.

Aktuell besteht die Behandlung der NEC in der Entlastung des Gastrointestinaltrakts mittels Einlage einer Magen- bzw. Dekompressionssonde, intravenöser Flüssigkeitszufuhr, breiter antibiotischer Abdeckung und ggfs. chirurgischer Intervention (58). Als zukünftige Therapiemöglichkeit wäre bei der NEC – als Erkrankung mit erhöhter Gewebsdestruktion – an eine lokale Hemmung spezifischer MMPs zu denken. Im TNBS-Kolitis-Modell führt der unselektive MMP-Inhibitor Ilomastat zu einem abgemilderten Verlauf der Kolitis (90). Im DSS-Kolitis-Modell zeigten Mäuse, bei denen selektiv MMP-3 und MMP-10 inhibiert wurden, eine deutlich verminderte Entzündungsreaktion (89).

### 3.1.2 Vorgänge in der extrazellulären Matrix bei der kollagenen Kolitis

Die chronische Entzündung in der Lamina propria bei der kollagenen Kolitis führt zu einer erhöhten Synthese der ECM und ihrer bandförmigen Ablagerung (>10 µm) unterhalb des oft atrophischen Oberflächenepithels sowie einer Lymphozyteninfiltration der Lamina propria. Wir und andere (74,91) konnten zeigen, dass sich die ECM-Schicht hauptsächlich aus Kollagen Typ I, III und VI und dem extrazellulären Glykoprotein Tenascin zusammensetzt. Mittels radioaktiver ISH konnten wir erstmals zeigen, dass eine erhöhte mRNA-Expression von Prokollagen  $\alpha 1(I)$ ,  $\alpha 1(IV)$  und TIMP-1 durch  $\alpha$ -Aktin-positive Zellen (i.S. der subepithelialen Myofibroblasten) in linearer Verteilung unterhalb der ECM-Schicht vorliegt bei nur punktuell erhöhter MMP-1-Expression und fehlender MMP-13-Expression (74).

Lakatos *et al.* konnten keine erhöhte MMP-9-Expression bei der kollagenen Kolitis nachweisen (92). Dieses mRNA-Expressionsmuster von MMP-1 (mit einer punktuell leicht erhöhten Expression), MMP-9, -13, Prokollagen  $\alpha 1(I)$  sowie TIMP-1 (mit linear erhöhter Expression) deuten auf ein Ungleichgewicht zwischen Fibrogenese und Fibrolyse zugunsten der Fibrogenese hin. Ein zukünftiger Therapieansatz könnte daher die lokale antifibrotische Therapie darstellen, z.B. mit selektiven TIMP-Inhibitoren, die lokal die Aktivität der MMPs erhöhen.

Interessanterweise zeigt eine seltene Unterform der Zöliakie, die kollagene Sprue, neben einer Zottenatrophie ebenfalls eine bandförmige ECM-Ablagerung unterhalb des Oberflächenepithels im Dünndarm. Auch hier setzt sich das kollagene Band aus Kollagen Typ I und III zusammen; es findet sich eine erhöhte Prokollagen  $\alpha 1(I)$ - und TIMP-1-Expression bei unverändertem MMP-1- und MMP-3-Gehalt (93).

Die zugrundeliegenden Mechanismen der übermäßigen ECM-Synthese bei der kollagenen Kolitis sind noch nicht gänzlich geklärt. Eine Untergruppe der ECM-Proteine stellt die CCN-Familie dar, die aus sechs Mitgliedern (CCN1-CCN6) besteht, wobei CCN2 dem CTGF entspricht. Die CCN-Proteine werden während der Embryonalzeit stark exprimiert und

koordinieren komplexe Prozesse wie die Entwicklung des kardiovaskulären Systems oder des Skelettsystems (94). Beim Erwachsenen sind die CCN-Proteine dagegen hauptsächlich bei der Wundheilung sowie Entzündungsprozessen mit nachfolgender Fibrose exprimiert (94).

Die CCN-Proteine können direkt an Integrinrezeptoren und andere Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und die Expression von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und MMPs regulieren (94). Sie können auch direkt mit Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF, TGF- $\beta$ ), MMPs und ECM-Proteinen (z.B. Fibronectin, Vitronectin) interagieren. Auf zellulärer Ebene regulieren CCN-Proteine die Zelladhäsion, Migration, Proliferation, Differenzierung und Apoptose (94). Während CCN1, CCN3 und CCN5 über unterschiedliche Mechanismen antifibrotisch agieren, wirken CTGF und CCN4 stark profibrotisch. Bei der Wundheilung und chronisch-fibrosierenden Erkrankungen fördert CTGF die Proliferation von (Myo-) Fibroblasten und steigert ihre Synthese von ECM-Komponenten (Kollagen I, Fibronectin) und die TIMP-Expression (21,95). So wurde bereits eine erhöhte CTGF-Expression bei vielen chronisch-entzündlichen und fibrosierenden Erkrankungen der Haut, Nieren, Leber, Lunge und des kardiovaskulären Systems nachgewiesen (96-99). Bei der Colitis ulcerosa und beim M. Crohn konnten wir eine signifikant erhöhte CTGF-Expression in entzündeten Arealen der Lamina propria und in Endothelzellen nachweisen. Dies stimmt mit den Daten von Dammeier *et al.* (52) überein, die eine erhöhte CTGF-Expression bei beiden Erkrankungen in entzündeten Arealen (Colitis ulcerosa und Crohn-Kolitis), aber auch in Arealen mit starker Fibrose und wenig Entzündung (Crohn-Kolitis) fanden.

Wir konnten erstmals mittels radioaktiver ISH eine signifikant erhöhte CTGF mRNA-Expression bei der kollagenen Kolitis nachweisen. Die CTGF-Expression fand dabei in Co-Lokalisation mit der Expression von Prokollagen  $\alpha 1(I)$  in den subepithelialen Myofibroblasten unterhalb der ECM-Schicht statt. Bei der lymphozytären Kolitis, bei der es zu keiner erhöhten ECM-Ablagerung in der subepithelialen Region kommt, konnten wir keine erhöhte CTGF-Expression nachweisen.

Die Expression der CCN-Proteine wird auf der Transkriptionsebene reguliert, d.h. verschiedene Stimuli können über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Expression der CCN-kodierenden Gene und zur schnellen Proteinsynthese führen. Zu den Stimuli gehören: TGF- $\beta$ 1 über Smad-Proteine, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  über NF- $\kappa$ B, Angiotensin II, VEGF und andere Wachstumsfaktoren (94). Welche Faktoren die CTGF-Expression bei der kollagenen Kolitis stimulieren, ist bislang noch nicht bekannt. Bei der kollagenen Kolitis konnte eine erhöhte TGF- $\beta$ 1-Expression durch Eosinophile und Fibroblasten nachgewiesen werden (100), sodass TGF- $\beta$ 1 auch *in vivo* für die hochregulierte CTGF-Expression verantwortlich sein könnte.

Immunhistochemisch konnte bei der kollagenen Kolitis eine VEGF-Expression in den Epithelzellen und in der Lamina propria durch Fibroblasten und Entzündungszellen nachgewiesen werden (101). Mittels einer koloskopisch durchgeführten segmentalen Spültechnik fanden sich erhöhte VEGF-Konzentrationen in der über jeweils eine Stunde gesammelten Spülflüssigkeit bei Patienten mit kollagener Kolitis im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (101). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass bei der mikroskopischen Kolitis (gemischtes Patientenkollektiv aus kollagener und lymphozytärer Kolitis) ein Th1-Zytokinprofil mit erhöhten INF- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -Spiegeln vorliegt (102).

Da die CCN-Proteine beim Erwachsenen fast ausschließlich im entzündeten Gewebe exprimiert werden, stellen sie einen attraktiven Ansatzpunkt für zukünftige Therapiekonzepte dar. Phase-I-Studien mit einem humanisierten, monoklonalen Antikörper gegen CTGF (FG-3019) bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose (103) sowie bei Patienten mit Typ-1- und Typ-2-Diabetes mellitus und Mikroalbuminurie (104) und Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom (105) konnten bereits eine antifibrotische Wirkung bei guter Verträglichkeit zeigen. Andere Ansatzpunkte sind „Antisense“- Oligonukleotide und siRNA, die die CTGF-Expression inhibieren und bereits erfolgreich in Tiermodellen getestet wurden (106).



### **3.1.3 Interleukin-10, Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -Antikörper und extrazelluläre Matrix**

Im entzündeten Gewebe wird die ECM durch Zytokine und Proteasen moduliert, die von infiltrierenden Zellen freigesetzt werden. Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$ , die im entzündeten Gewebe in hohen Konzentrationen vorkommen, können die Synthese und den Abbau der ECM, insbesondere der MMPs beeinflussen. Erstmals wurde die T-Zell-vermittelte Wirkung auf die intestinale ECM von Pender *et al.* am humanen fetalen Dünndarm Explantationskultursystem untersucht (37). Fetale Dünndarm Explantationskulturen stellen ein experimentelles Enteropathiesystem dar, bei dem die Lamina propria T-Zellen direkt durch Mitogene oder Superantigene aktiviert werden können (77-79). In diesem Modell kommt es nach T-Zellstimulation durch PWM zu einer erhöhten Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , gefolgt von einer deutlich erhöhten Expression verschiedener MMPs (MMP-1, -3, -9, -10, -12) und einer Gewebsdestruktion (37,107). Die MMPs werden dabei größtenteils von Myofibroblasten unterhalb des Oberflächenepithels gebildet, die in Nachbarschaft zu T-Zellen und Makrophagen in der Mukosa liegen.

IL-10, ein vor allem von regulatorischen T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen produziertes Zytokin, hemmt die Synthese von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 und inhibiert überschießende Th1-Immunantworten (108). Im Mausmodell führt die Inaktivierung des IL-10 Gens zu einer chronischen Enterokolitis (109). Mutationen des IL-10-Gens oder des IL-10-Rezeptorgens können zu einer seltenen Form der CED bei Kleinkindern führen (110-114).

Wir konnten erstmals zeigen, dass nach Zugabe von rekombinanten IL-10 in das fetale Dünndarm Explantationssystem die Synthese von MMP-1, MMP-3 und TIMP-1 dosisabhängig gehemmt wurde. Klinische Studien mit rekombinantem IL-10 konnten aber bisher keine signifikante klinische Besserung von Patienten mit leicht- bis mittelgradig aktivem oder steroid-refraktärem M. Crohn (115,116) nachweisen. Im TNBS-Mausmodell zeigten allerdings lokale Therapieansätze mit gentechnisch veränderten IL-10 produzierenden *Lactococcus*-Bakterien positive Effekte (117,118).

Im fetalen Dünndarm Explantationssystem konnte die Zugabe des humanen p55 TNF-Rezeptor IgG1-Fusionsprotein ebenfalls die MMP-Produktion und nachfolgende Gewebsdestruktion hemmen (119). TNF- $\alpha$  führt über NF- $\kappa$ B-Aktivierung zur Stimulation der MMPs, insbesondere MMP-3, und zu einer mukosalen Gewebsdestruktion.

*In vivo* konnten Di Sabatino *et al.* zeigen, dass es nach zehnwöchiger Gabe des TNF- $\alpha$ -Antikörpers Infliximab bei M. Crohn-Patienten, die auf Infliximab ansprachen, im Kolangewebe zu einer deutlichen Reduktion der MMP-3- und -12-mRNA- und Proteinexpression kommt (120). Bei „non-respondern“ zeigte sich nach der Infliximabgabe keine Änderung der MMP-3- und MMP-12-Expression (120). In einer großen Studie wurde die mukosale Expression von 24 MMPs, TIMPs und über 150 Wachstumsfaktoren bei Patienten vor und nach der Behandlung mit Infliximab mittels Microarray gemessen. Vor Infliximabgabe zeigte eine eine erhöhte Expression der nahezu aller MMPs (mit Ausnahme von MMP-28); nach Infliximabgabe kam es bei „respondern“ zu einer Normalisierung der MMP-Expression (121).

Auch fanden sich verminderte MMP-9-Serumspiegel bei M. Crohn-Patienten, die auf Infliximab ansprachen (122). Ein im Serum messbarer Komplex aus mit Neutrophiler Gelatinase B-assoziiertem Lipocalin und MMP-9 wurde als Surrogatmarker für die mukosale Heilung nach Infliximab-Gabe beschrieben (123).

*In vitro* fanden sich bei Myofibroblastenkulturen von M. Crohn-Patienten nach TNF- $\alpha$ -Antikörpergabe eine vermehrte TIMP-1-Expression und eine verstärkte Myofibroblastenmigration (124). Die TNF- $\alpha$ -Antikörpertherapie führt zu einer Reduktion des MMP-vermittelten ECM-Abbaus und dadurch zur Abheilung der mukosalen Läsionen und Fisteln.

### **3.1.4 Ausblick**

Verschiedene chronisch-entzündliche Darmerkrankungen gehen mit Gewebsdestruktionen und Fibrose einher. Bei der Colitis ulcerosa und beim M. Crohn können sowohl ulzeröse als auch fibrotische Veränderungen auftreten, insbesondere beim M. Crohn kommt es häufig zu fibrotischen Stenosen und Fistelbildungen. Bei der kollagenen Kolitis steht die Fibrosebildung mit der bandförmigen ECM-Ablagerung unterhalb des Oberflächenepithels im Vordergrund, während diese Veränderung bei der lymphozytären Kolitis nicht vorliegt.

Interessant bleibt die Frage, welche Mechanismen bei chronischen Entzündungen die Fibrosebildung triggern und welche eher zu Gewebsdestruktionen führen. Eine Möglichkeit wäre, dass es abhängig von der initialen Schädigung (z.B. der Art des Erregers und dem Ausmaß des Epithelschadens) zur Infiltration unterschiedlicher Zellarten kommt und damit unterschiedliche Zytokinprofile im entzündeten Gewebe vorliegen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Defekte der ECM zur Veränderung des aus der ECM freigesetzten Profils von Wachstumsfaktoren führen, und dadurch ein Ungleichgewicht der profibrotischen CCN-Proteine gegenüber den antifibrotischen CCN-Proteinen bzw. der proinflammatorischen MMPs (MMP-1, -3, -9, -12, -13) gegenüber den antiinflammatorischen MMPs (MMP-2,-10,-14) bedingen.

Zukünftige Forschungsarbeiten werden sich mit der Frage befassen, welche Rolle die ECM bei der Modulation und Aufrechterhaltung chronischer Entzündungsreaktionen spielt und welche weiteren therapeutischen Interventionsmöglichkeiten sich bieten könnten.

### **3.2 CD3-7<sup>+</sup> Zellen als mögliche NK- und T-Zellvorläufer**

Im fetalen Darm wurde eine große CD3-7<sup>+</sup> Zellpopulation beschrieben (81). Die CD3-7<sup>+</sup> Zellen können bereits ab der 7. Schwangerschaftswoche p.c. nachgewiesen werden - kurz nach Beginn der Hämatopoese in der fetalen Leber (ab der 5. bis maximal 8. Woche) und um

den Zeitraum herum, in dem der fetale Thymus mit CD7<sup>+</sup>-Vorläuferzellen besiedelt wird. CD3<sup>+</sup> Zellen, hingegen, finden sich erstmals ab der 8. bis 9. Woche p.c. vereinzelt im fetalen Darm. Ihre Anzahl nimmt stetig zu und erreicht in der 20. Woche ca. 1/3 der T-Zellzahlen des adulten Darms.

Wir konnten zeigen, dass ein Großteil der CD3-7<sup>+</sup> Zellpopulation die NK-Marker CD56, CD94 und CD161 exprimiert, wohingegen CD3<sup>+</sup> Zellen zwar CD161-Expression aufwiesen, aber nur selten eine CD56- oder CD94-Expression. Andere Arbeiten hatten bereits nachgewiesen, dass NK-Rezeptor-besetzte CD3- IELs im adulten Dünndarm eine höhere zytotoxische Aktivität vorweisen als CD3<sup>+</sup> IELs (125). So könnten die NK-Rezeptor besetzten CD3-7<sup>+</sup> Zellen einen Teil des angeborenen Immunsystems darstellen – insbesondere direkt nach der Geburt, wenn der Darmtrakt des Neugeborenen erstmals in Kontakt mit exogenen Antigenen tritt.

Wir konnten ferner zeigen, dass CD3-7<sup>+</sup> Zellen zu CD3<sup>+</sup> Zellen heranreifen können. Während der T-Zellentwicklung werden die Gene des TCR aus einer Auswahl von DNA Abschnitten neu zusammengeführt, d.h. rekombiniert. Die Rekombination der  $\gamma$ -Kette findet dabei zeitlich vor der Rekombination der TCR- $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette statt und ist damit ein sehr frühes Zeichen für eine beginnende Entwicklung hin zur T-Zelle. Wir konnten bereits rekombinierte TCR- $\gamma$ - Ketten in den CD3-7<sup>+</sup> Zellen des fetalen und adulten Darms nachweisen. Ein Teil der CD3-7<sup>+</sup> Zellen exprimiert intrazelluläres CD3 $\epsilon$ , das bei NK- und T-Zellvorläuferzellen gefunden wird (126,127).

In ein murines Thymusorgankultursystem wurden gereinigte CD3-7<sup>+</sup> Zellen eingebracht. Nach 14 Tagen im Kultursystem zeigten ca. 30% der CD3-7<sup>+</sup> Zellen eine CD3-Expression auf ihrer Zelloberfläche. Bei der fetalen Leber (6. bis 8. Woche p.c.) war bereits demonstriert worden, dass isolierte CD3- Zellen sich im Kultursystem zu CD3<sup>+</sup> Zellen entwickeln können (128), was vermuten lässt, dass diese Zellen keine Emigranten aus dem Thymus sind und dass eine extrathymische T-Zellentwicklung möglich ist.

CD3-7<sup>+</sup> Zellen finden sich auch im adulten Darm. Diese von uns und anderen charakterisierten Zellen könnten eine physiologische Vorläuferzellpopulation der aberranten (CD3-7<sup>+</sup> CD4/8<sup>-</sup>, intrazellulär CD3<sup>+</sup>) T-Zellpopulation bei der refraktären Sprue Typ II darstellen (129). Bei der refraktären Sprue Typ II kommt es trotz strikt Gluten-freier Diät unter IL-15 Einfluss zu einer massiven Expansion dieses Zelltyps im Bereich der intraepithelialen Lymphozytenpopulation. In geringerem Maße sind diese aberranten Zellen aber auch in der Lamina propria, in Hautveränderungen oder in der Lunge bei Patienten mit refraktärer Sprue Typ II nachgewiesen worden (130-132). Fünfzig bis 60% der Patienten entwickeln im Verlauf ein Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom (133).

Die CD3-7<sup>+</sup> Zellen scheinen somit eine heterogene Zellpopulation darzustellen; eine NK-Zellrezeptor exprimierende Subpopulation erscheint als NK-Zellen oder NK-Zell-Vorläufer, eine weitere Subpopulation sind T-Zell-Vorläufer, die intrazellulär CD3 exprimieren (81), rekombinierte TCR- $\gamma$ -Ketten aufweisen und im Thymusorgankultursystem zu CD3<sup>+</sup> Zellen heranreifen können.

### **3.3 Endostatin als aktives Fragment des Kollagen Typ XVIII**

C18 ist ein nicht-fibrilläres Kollagen und Proteoglykan, das ubiquitär im Körper in Basalmembranen von Blutgefäßen und Epithelien exprimiert wird (134,135). Sein C-terminales Fragment, das Endostatin, wurde 1997 erstmals von O'Reilly und Folkman aus einem murinen Hämangioendotheliom isoliert (82). Es inhibiert die Angiogenese und das Tumorwachstum durch die Hemmung der Proliferation (82) und Migration (136) der Endothelzellen und die Induktion ihrer Apoptose (137). Dabei kann die Wirkung des Endostatins direkt durch Bindung an Rezeptoren auf den Zelloberflächen erfolgen (z.B. an das Integrin  $\alpha 5\beta 1$  oder an den VEGF-Rezeptor) (138,139). Ferner zeigt Endostatin eine antifibrotische Wirkung; es senkt die TGF- $\beta$ - und Kollagen I-Proteinkonzentrationen im

Zellkulturüberstand bei kultivierten hepatischen Sternzellen (140) und kann die Aktivierung von proMMP-2, proMMP-9 und proMMP-13 sowie die Aktivität der MMP-2 und der MT-MMPs hemmen (141,142). Endostatin wird aus dem C18 durch Proteasen wie MMP-3, -7, -9, -13, -14, -20, Elastase und Cathepsin L freigesetzt (143-147).

C18 existiert in drei Varianten, wobei die kurze Variante in den Basalmembranen der Gefäße und Epithelien gefunden wird und die beiden längeren Varianten insbesondere in der Leber vorkommen (135). In der humanen Leber findet sich ein hoher C18-Gehalt in den Perisinusoidalräumen und in den Basalmembranzonen. Die Synthese des C18 erfolgt durch Hepatozyten, aktivierte hepatische Sternzellen und in geringerem Ausmaß durch die Epithelzellen der kleinen Gallengänge sowie durch Endothelzellen (83,84). Wir konnten mittels radioaktiver ISH erstmals zeigen, dass die Karzinomzellen bei Kolontumoren und ihren Lebermetastasen keine C18-Expression aufwiesen. Dagegen fand sich eine hohe C18-Expression in den Tumorstromazellen, die phänotypisch Myo-/Fibroblasten und Endothelzellen kleinerer Gefäße und Kapillaren entsprachen. Bei Ovarialkarzinomen zeigt sich hingegen eine starke C18-Expression durch die Karzinomzellen, als auch durch das Tumorstroma.

Diese stark variable C18-Expression unterschiedlicher Epithelzellen, spricht zunächst gegen eine wichtige Funktion von C18 bei der frühen Tumorgenese. Die hohe C18-Expression im peritumoralen Stroma (durch Fibroblasten und Endothelzellen) kann im Rahmen der erhöhten stromalen ECM-Synthese gesehen werden, die ihrerseits durch Freisetzung von Proteasen mitbeteiligt ist am Durchbruch der Basalmembran und damit am Tumorwachstum (148).

Während C18 das Überleben der Endothelzellen und die Angiogenese zu fördern scheint, ist das C-terminale Fragment von C18, das Endostatin, ein potenter Inhibitor der Angiogenese.

Cathepsin L, eine der Proteasen, die an der Freisetzung von Endostatin beteiligt sind, wird durch kolorektale Karzinome und durch die kolorektale Karzinomzelllinie HT-29 exprimiert (149-152). Möglicherweise können epitheliale Tumore auf diese Weise ihre Wachstumsrate

beeinflussen. Das Gleichgewicht zwischen C18-Expression und Cathepsin L, Elastase oder anderen Proteasen, die an der Endostatinfreisetzung beteiligt sind, könnte daher bei der Regulation der Angiogenese und des Tumorwachstums essentiell sein. Die lokale C18-Synthese durch Tumorzellen eröffnet daher die Möglichkeit, durch die Induktion einer dieser Proteasen, das Tumorwachstum zu unterdrücken.

Es konnte in verschiedenen Mausmodellen gezeigt werden, dass Endostatin die Angiogenese, die Lymphangiogenese, das Tumorwachstum von kolorektalen Tumoren und die lymphogene Metastasierung hemmt (153,154). Rekombinantes Endostatin wird derzeit im Rahmen von klinischen Studien beim fortgeschrittenen Kolonkarzinom (155), beim klein- und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (156,157) sowie beim Pankreaskarzinom (158) untersucht.

Neben seiner inhibierenden Wirkung auf die tumorbedingt gesteigerte Angiogenese wirkt Endostatin auch hemmend auf die entzündungsbedingt gesteigerte Angiogenese. Im Tierversuch mit rekombinatem Endostatin konnte seine antiangiogenetische, antiinflammatorische und antifibrotische Wirkung bei der TNF- $\alpha$ -induzierten Arthritis (159), der akuten Cyclophosphamid-induzierten Zystitis (160), drei verschiedenen Kolitis-Modellen (161) und bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose (162) belegt werden.

## 4 Zusammenfassung

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist eine dreidimensionale Matrix, die die Zellen umgibt und für die Strukturbildung der Gewebe grundlegend ist. Sie besteht aus Proteoglykanen und Faserproteinen, aber auch aus den in ihr befindlichen Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren, aktiven ECM-Fragmenten und zellmembrangebundenen Molekülen. Unter physiologischen Bedingungen sind Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) in geringen Konzentrationen verantwortlich für den Strukturerhalt der ECM. Bei entzündlichen Prozessen stimulieren aus T-Zellen und anderen infiltrierenden Zellen freigesetzte Zytokine (insbesondere Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  und *Transforming Growth Factor*- $\beta$ 1) die Expression der ECM-Komponenten (z. B. Kollagene, MMPs, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*, TIMPs). Dabei können größere Mengen von aktivierten MMPs, die nicht mehr durch ihre Inhibitoren, die TIMPs, kontrolliert werden können, zu Gewebsdestruktionen führen. Tritt während des Entzündungsvorgangs ein überschießender Wundheilungsprozeß auf mit vermehrter Bildung und Ablagerung der ECM, entsteht eine Fibrose. Die ECM ist darüber hinaus selber in der Lage, die lokal ansässigen und infiltrierenden Zellen zu beeinflussen und dadurch den Verlauf einer Entzündung zu modulieren. In dieser kumulativen Habilitationsschrift wurde die ECM bei verschiedenen entzündlichen Darmerkrankungen untersucht.

Die nekrotisierende Enterokolitis (NEC) ist eine zumeist bei Frühgeborenen auftretende entzündliche Darmerkrankung, bei der es nach Kontakt mit der intestinalen Mikrobiota im noch nicht ausgereiften Darm zu einer überschießenden Entzündungsreaktion mit schweren Gewebsdestruktionen kommen kann. Wir konnten erstmals bei dieser Erkrankung eine erhöhte MMP-3- und TIMP-1-Expression zeigen. Weiterhin konnte eine erhöhte Expression von MMP-7, -12 und -26 nachgewiesen werden. Damit scheinen mehrere MMPs an dem



Gewebsumbau beteiligt zu sein. Als zukünftige Therapiemöglichkeit wäre bei der NEC – als Erkrankung mit erhöhter Gewebsdestruktion – eine lokale Hemmung spezifischer MMPs denkbar.

Bei der kollagenen Kolitis, einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung, die mit chronisch-wässrigen Diarrhöen einhergeht, liegt eine verbreiterte ECM-Schicht unterhalb des Oberflächenepithels vor. Sie setzt sich hauptsächlich aus Kollagen Typ I, III, VI und Tenascin zusammen in Abwesenheit von Undulin, einem Marker für dichtere ausdifferenzierte Kollagenmatrizes. Wir konnten nachweisen, dass eine linear erhöhte Expression des profibrotischen *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) sowie des Prokollagen  $\alpha 1(I)$ ,  $\alpha 1(IV)$  und TIMP-1 durch die subepithelialen Myofibroblasten unterhalb der ECM-Schicht vorliegt bei einer nur punktuell leicht erhöhten MMP-1-Expression. Das Gleichgewicht zwischen Fibrogenese und Fibrolyse ist zugunsten der Fibrogenese verschoben. Lokal antifibrotische Therapieansätze wären denkbar. Studien mit einem humanisierten, monoklonalen Antikörper gegen CTGF werden bereits bei anderen Krankheitsentitäten durchgeführt.

Im entzündeten Gewebe modulieren Zytokine und Proteasen, die von infiltrierenden Zellen freigesetzt werden, die ECM. Die T-Zell-vermittelte Wirkung auf die intestinale ECM wurde am humanen fetalen Dünndarm Explantationskultursystem untersucht. Wir konnten erstmals zeigen, dass nach Zugabe von rekombinanten Interleukin (IL)-10 in dieses experimentelle Enteropathiesystem die Synthese von MMP-1, MMP-3 und TIMP-1 dosisabhängig gehemmt wird. Während IL-10 in klinischen Studien bisher zu keiner signifikanten Verbesserung der Behandlung von M. Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten führte, zeigten lokale Therapieansätze mit gentechnisch veränderten IL-10 produzierenden *Lactococcus*-Bakterien im Mausmodell positive Effekte.

Im fetalen Darm findet sich eine CD3-7<sup>+</sup> Zellpopulation, die ein *Natural Killer* (NK)-Marker-Profil aufweist und vermutlich einen wichtigen Teil der angeborenen Immunität darstellt – insbesondere direkt nach der Geburt. Eine Subpopulation der CD3-7<sup>+</sup> Zellen exprimiert intrazellulär CD3, zeigt rekombinierte  $\gamma$ -Ketten und kann im murinen Thymusorgankultursystem zu CD3<sup>+</sup> Zellen heranreifen, sodass diese Zellen im heranwachsenden Darm möglicherweise extrathymisch eine T-Zelldifferenzierung durchlaufen.

In der letzten, dieser kumulativen Habilitationsschrift zugrunde liegenden Arbeit wurde Kollagen Typ XVIII (C18), ein nicht-fibrilläres Kollagen und Proteoglykan der ECM untersucht. Endostatin ist ein 20 kDa Fragment vom C-terminalen Ende des C18, das durch mehrere MMPs, Cathepsin L und andere Proteasen freigesetzt wird. Es ist ein potenter endogener Angiogenesehemmer. Frühere Studien konnten eine hohe C18-Expression in der humanen Leber und hepatozellulären Karzinomen nachweisen. Wir konnten zeigen, dass die Karzinomzellen bei Kolontumoren und ihren Lebermetastasen keine C18-Expression aufwiesen. Dagegen fand sich eine hohe C18-Expression in den Tumorstromazellen, die phänotypisch Fibroblasten und Endothelzellen kleinerer Gefäße und Kapillaren entsprachen. Bei Ovarialkarzinomen zeigte sich hingegen eine starke C18-Expression durch die Karzinomzellen, als auch durch das Tumorstroma. Die lokale Synthese des C18 durch Tumorzellen und das Tumorstroma könnte daher zukünftig die Möglichkeit eröffnen, durch die Induktion einer der Endostatin-freisetzenden Proteasen, das Tumorwachstum zu unterdrücken. In verschiedenen Tiermodellen konnte neben der antiangiogenetischen Wirkung des Endostatins bei Tumoren auch seine antiinflammatorische, antiangiogenetische und antifibrotische Wirkung bei Entzündungen belegt werden. Zukünftige klinische Studien werden zeigen, ob Endostatin auch bei der Therapie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle spielen wird.

## 5 Literatur

- 1 Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 2012;18:1028-1040.
- 2 Fiocchi C, Lund PK. Themes in fibrosis and gastrointestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:677-683.
- 3 Rieder F, Karrasch T, Ben-Horin S, Schriber A, Eehalt R, Wehkamp J, de Haar C, Velin D, Latella G, Scaldaferri F, Rogler G, Higgins P, Sans M. Results of the 2nd scientific workshop of the ECCO(III): basic mechanisms of intestinal healing. *J Crohns Colitis* 2012;6:373-385.
- 4 Latella G, Sferra R, Specia S, Vetuschi S, Gaudio E. Can we prevent, reduce or reverse intestinal fibrosis in IBD? *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013;17:1283-1304.
- 5 Gustavsson A, Magnuson A, Blomberg B, Andersson M, Halfvarson J, Tysk C. Endoscopic dilation is an efficacious and safe treatment of intestinal strictures in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;36:151-158.
- 6 Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 2009;326:1216-1219.
- 7 Sorokin L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:712-723.
- 8 Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res* 2010;339:247-257.
- 9 Woessner JF. The matrix metalloproteinase family. San Diego Academic Press, In Parks WC, Mecham RP (Hrsg.). *Matrix Metalloproteinases* 1998:1-14.
- 10 Nissinen L, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840:2571-2580.
- 11 Rath T, Roderfeld M, Graf J, Roeb E. Matrix-Metalloproteinasen bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen – von der Grundlagenforschung zu klinischen Bedeutung. *Z Gastroenterol* 2009;47:758-769.
- 12 Li NG, Tang YP, Duan JA, Shi ZH. Matrix metalloproteinase inhibitors: a patent review (2011 - 2013). *Expert Opin Ther Patents* 2014;24:1039-1052.
- 13 Di Sebastiano P, di Mola FF, Artese L, Rossi C, Mascetta G, Pernthaler H, Innocenti P. Beneficial effects of Batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in rat experimental colitis. *Digestion* 2001;63:234-239.
- 14 Flier SN, Tanjore H, Kokkotou EG, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Identification of epithelial to mesenchymal transition as a novel source of fibroblasts in intestinal fibrosis. *J Biol Chem* 2010;285:20202-20212.
- 15 Derynck R, Muthusamy BP, Saeteurn KY. Signaling pathway cooperation in TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* 2014;31:56-66.
- 16 Scharl M, Frei S, Pesch T, Kellermeier S, Arikkat J, Frei P, Fried M, Weber A, Jehle E, Rühl A, Rogler G. Interleukin-13 and transforming growth factor  $\beta$  synergise in the pathogenesis of human intestinal fistulae. *Gut* 2013;62:63-72.
- 17 Latella G, Rogler G, Bamias G, Breynaert C, Florholmen J, Pellino G, Reif S, Specia S, Lawrance IC. Results of the 4<sup>th</sup> scientific workshop of the ECCO(I): Pathophysiology of intestinal fibrosis in IBD. *J Crohn's and Colitis* 2014;8:1147-1165.
- 18 Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J* 1999;13:2105-2124.
- 19 Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000;19:1745-1754.

- 20 Fichtner-Feigl S, Young CA, Kitani A, Geissler EK, Schlitt HJ, Strober W. IL-13 signaling via IL-13R $\alpha$ 2 induces major downstream fibrogenic factors mediating fibrosis in chronic TNBS colitis. *Gastroenterology* 2008;135:2003-2013.
- 21 Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 1996;107:404-411.
- 22 Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359:693-699.
- 23 Kulkarni AB, Karlsson S. Transforming growth factor-beta 1 knockout mice: a mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am J Pathol* 1993;143:3-9.
- 24 Gorelik L, Flavell RA. Abrogation of TGF beta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 2000;12:171-181.
- 25 Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T, Inoue N, Morita R, Ichiyama K, Takahashi R, Asakawa M, Muto G, Mori T, Hasegawa E, Saika S, Hara T, Nomura M, Yoshimura A. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *J Immunol* 2010;185:842-855.
- 26 Schreiber S, Rosenstiel P, Franke A. Genetic etiology of chronic inflammatory bowel disease. *Internist* 2014;55:156-164.
- 27 Rivas MA, Beaudoin M, Gardet A, Stevens C, Sharma Y, Zhang CK, Boucher G, Ripke S, Ellinghaus D, Burt N, Fennell T, Kirby A, Latiano A, Goyette P, Green T, Halfvarson J, Haritunians T, Korn JM, Kuruvilla F, Lagacé C, Neale B, Lo KS, Schumm P, Törkvi L; National Institute of Diabetes and Digestive Kidney Diseases Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium (NIDDK IBDGC); United Kingdom Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium; International Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium, Dubinsky MC, Brant SR, Silverberg MS, Duerr RH, Altshuler D, Gabriel S, Lettre G, Franke A, D'Amato M, McGovern DP, Cho JH, Rioux JD, Xavier RJ, Daly MJ. Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2011;43:1066-1073.
- 28 Sokol H, Lay C, Seksik P, Tannock GW. Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: what has it revealed? *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:858-867.
- 29 Abraham C, Medzhitov R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011;140:1729-1737.
- 30 Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* 2014;146:1489-1499.
- 31 Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006;444:1027-1131.
- 32 Couturier-Maillard A, Secher T, Rehmann A, Normand S, De Arcangelis A, Haesler R, Huot L, Grandjean T, Bressenot A, Delanoye-Crespin A, Gaillot O, Schreiber S, Lemoine Y, Ryffel B, Hot D, Nùñez G, Chen G, Rosenstiel P, Chamaillard M. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J Clin Invest* 2013;123:700-711.
- 33 Moayyedi P, Surette MG, Kim PT, Libertucci J, Wolfe M, Onischi C, Armstrong D, Marshall JK, Kassam Z, Reinisch W, Lee CH. Fecal Microbiota transplantation induces remission in patients with active ulcerative colitis in a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2015;149:102-109.

- 34 Rossen NG, Fuentes S, van der Spek MJ, Tijssen JG, Hartman JHA, Duflou A, Löwenberg M, van den Brink GR, Manthus-Vliegen EMH, de Vos WH, Zoetendal EG, D'Haens GR, Ponsioen CY. Findings from a randomized controlled trial of fecal transplantation for patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2015;149:110-118.
- 35 Bamias G, Okazawa A, Rivera-Nieves J, Arseneau KO, De La Rue SA, Pizarro TT, Cominelli F. Commensal bacteria exacerbate intestinal inflammation but are not essential for the development of murine ileitis. *J Immunol* 2007;178:1809–1818.
- 36 Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev* 2014;13:3-10.
- 37 Pender SL, Tickle SP, Docherty AJ, Howie D, Wathen NC, MacDonald TT. A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol* 1997;158:1582-1590.
- 38 Arihiro S, Ohtani H, Hiwatashi N, Torii A, Sorsa T, Nagura H. Vascular smooth muscle cells and pericytes express MMP-1, MMP-9, TIMP-1 and type I procollagen in inflammatory bowel disease. *Histopathology* 2001;39:50-59.
- 39 Bailey CJ, Hembry RM, Alexander A, Irving MH, Grant ME, Shuttleworth CA. Distribution of the matrix metalloproteinases stromelysin, gelatinases A and B, and collagenase in Crohn's disease and normal intestine. *J Clin Pathol* 1994;47:113-116.
- 40 Baugh MD, Perry MJ, Hollander AP, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, Taylor CJ, Evans GS. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1999;117:814-822.
- 41 Saarialho-Kere UK, Vaalamo M, Puolakkainen P, Airola K, Parks WC, Karjalainen-Lindsberg ML. Enhanced expression of matrilysin, collagenase, and stromelysin-1 in gastrointestinal ulcers. *Am J Pathol* 1996;148:519-526.
- 42 Stallmach A, Chan CC, Ecker KW, Feifel G, Herbst H, Schuppan D, Zeitz M. Comparable expression of matrix metalloproteinases 1 and 2 in pouchitis and ulcerative colitis. *Gut* 2000;47:415-422.
- 43 Vaalamo M, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Kere J, Saarialho-Kere U. Distinct expression profiles of stromelysin-2 (MMP-10), collagenase-3 (MMP-13), macrophage metalloelastase (MMP-12), and tissue inhibitors of metalloproteinase-3 (TIMP-3) in intestinal ulcerations. *Am J Pathol* 1998;152:1005-1014.
- 44 von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000;47:63-73.
- 45 Mäkitalo L, Kolho KL, Karikoski R, Anthoni H, Saarialho-Kere U. Expression profiles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colonic inflammation related to pediatric inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2010;45:862-871.
- 46 Rath T, Roderfeld M, Halwe JM, Tschuschner A, Roeb E, Graf J. Cellular sources of MMP-7, MMP-13 and MMP-28 in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2010;45:1186-1196.
- 47 Vizoso FJ, Gonzalez LO, Corte MD, Corte MG, Bongera M, Martinez A Martín A, Andicoechea A, Gava RR. Collagenase-3 (MMP-13) expression by inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2006;41:1050-1055.
- 48 Heuschkel RB, MacDonald TT, Monteleone G, Bajaj-Elliott M, Smith JAW, Pender SL. Imbalance of stromelysin-1 and TIMP-1 in the mucosal lesions of children with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000;47:57-62.
- 49 Heimesaat MM, Dunay IR, Fuchs D, Trautmann D, Fischer A, Kühl AA, Loddenkemper C, Siegmund B, Batra A, Bereswill S, Liesenfeld O. The distinct roles

- of MMP-2 and MMP-9 in acute DSS colitis. *Eur J Microbiology and Immunology* 2011;4:302-310.
- 50 Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2001;108:601-609.
- 51 Di Sabatino A, Jackson CL, Pickard KM, Buckley M, Rovedatti L, Leakey NAB, Picariello L, Cazzola P, Monteleone G, Tonelli F, Corazza GR, MacDonald TT, Pender SL. Transforming growth factor  $\beta$  signalling and matrix metalloproteinases in the mucosa overlying Crohn's disease strictures. *Gut* 2009;58:777-789.
- 52 Dammeier J, Brauchle M, Falk W, Grotendorst G, Werner S. Connective tissue growth factor: a novel regulator of mucosal repair and fibrosis in inflammatory bowel disease. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:909-922.
- 53 Beddy D, Mulsow J, Watson RW, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Expression and regulation of connective tissue growth factor by transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha in fibroblasts isolated from strictures in patients with Crohn's disease. *Br J Surg* 2006;93:1290-1296.
- 54 Bailey JR, Bland PW, Tarlton JF, Peters I, Moorghen M, Sylvester PA, Probert CS, Whiting CV. IL-13 promotes collagen accumulation in Crohn's disease fibrosis by down-regulation of fibroblast MMP synthesis: a role for innate lymphoid cells? *PLoS One* 2012;7:e52332.
- 55 Monteleone G, Neurath MF, Ardizzone S, Di Sabatino A, Fantini MC, Castiglione F, Scribano ML, Armuzzi A, Caprioli F, Sturniolo GC, Rogai F, Vecchi M, Atreya R, Bossa F, Onali S, Fichera M, Corazza GR, Biancone L, Savarino V, Pica R, Orlando A, Pallone F. Mongersen, an oral SMAD7 antisense oligonucleotide, and Crohn's disease. *N Engl J Med* 2015;372:1104-1113.
- 56 Jaszewski R, Tolia V, Ehrinpreis MN, Bodzin JH, Peleman RR, Korlipara R, Weinstock JV. Increased colonic mucosal angiotensin I and II concentrations in Crohn's colitis. *Gastroenterology* 1990;98:1542-1548.
- 57 Wengrower D, Zanninelli G, Latella G, Necozone S, Metanes I, Israeli E, Lysy J, Pines M, Papo O, Goldin E. Lorsatan reduces trinitrobenzene sulphonic acid-induced colorectal fibrosis in rats. *Can J Gastroenterol* 2012;26:33-39.
- 58 Berman L, Moss RL. Necrotizing enterocolitis: an update. *Semin Fetal Neonatal Med* 2011;145-150.
- 59 Kliegman RM, Fanaroff AA. Necrotising enterocolitis. *N Engl J Med* 1984;310:1093-1103.
- 60 Lindström CG. Collagenous colitis with watery diarrhoea: a new entity? *Pathol Eur* 1976;11:87-89.
- 61 Wickbom A, Bohr J, Eriksson S, Udumyan R, Nyhlin N, Tysk C. Wickbom A, Nyhlin NES, Bohr J, Tysk C. Stable incidence of collagenous colitis and lymphocytic colitis in Örebro, Sweden, 1999-2008: a continuous epidemiologic study. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:2387-2393.
- 62 Gentile NM, Khanna S, Loftus EV Jr, Smyrk TC, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Kammer PP, Pardi DS. The epidemiology of microscopic colitis in Olmsted County from 2002 to 2010: a population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;12:838-842.
- 63 Bonderup OK<sup>1</sup>, Wigh T, Nielsen GL, Pedersen L, Fenger-Grøn M. The epidemiology of microscopic colitis: a 10-year pathology-based nationwide Danish cohort study. *Scand J Gastroenterol* 2015;50:393-398.
- 64 Verhaegh BP, Jonkers DM, Driessen A, Zeegers MP, Keszthelyi D, Masclee AA, Pierik MJ. Incidence of microscopic colitis in the Netherlands. A nationwide population-based study from 2000 to 2012. *Dig Liver Dis* 2015;47:30-36.

- 65 Abdo AA, Zetler PJ, Halparin LS. Familial microscopic colitis. *Can J Gastroenterol* 2001;15:341–343.
- 66 Jarnerot G, Hertervig E, Granno C, Thorhallsson E, Eriksson S, Tysk C, Hansson I, Björknäs H, Bohr J, Olesen M, Willén R, Kagevi I, Danielsson A. Familial occurrence of microscopic colitis: a report on five families. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:959–962.
- 67 Fine KD, Do K, Schulte K, Ogunji F, Guerra R, Osowski L, McCormack J. High prevalence of celiac sprue-like HLA-DQ genes and enteropathy in patients with the microscopic colitis syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1974–1982.
- 68 Koskela RM, Karttunen TJ, Niemela SE, Lehtola JK, Ilonen J, Karttunen RA. Human leucocyte antigen and TNFalpha polymorphism association in microscopic colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20:276–282.
- 69 Fernandez-Banares F, Esteve M, Farre C, Salas A, Alsina M, Casalots J, et al. Predisposing HLA-DQ2 and HLA-DQ8 haplotypes of coeliac disease and associated enteropathy in microscopic colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:1333–1338.
- 70 Burgel N, Bojarski C, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis. *Gastroenterology* 2002;123:433–443.
- 71 Barmeyer C, Erko I, Fromm A, Bojarski C, Allers K, Moos V, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Ion transport and barrier function are disturbed in microscopic colitis. *Ann NY Acad Sci* 2012;1258:143-148.
- 72 Bohr J, Jarnerot G, Tysk C, Jones I, Eriksson S. Effect of fasting on diarrhoea in collagenous colitis. *Digestion* 2002;65:30–34.
- 73 Bohr J, Wickbom A, Hegedus A, Nyhlin N, Hultgren Hörnquist E, Tysk C. Diagnosis and management of microscopic colitis: current perspectives. *Clin Exp Gastroenterol* 2014;7:273-284.
- 74 Günther U, Schuppan D, Bauer M, Matthes H, Stallmach A, Schmitt-Gräff A, Riecken EO, Herbst H. Fibrogenesis and fibrolysis in collagenous colitis. Patterns of procollagen types I and IV, matrix-metalloproteinase-1 and -13, and TIMP-1 gene expression. *Am J Pathol* 1999;155:493-503.
- 75 Gad M, Brimnes J, Claesson MH. CD4+ T regulatory cells from the colonic lamina propria of normal mice inhibit proliferation of enterobacteria-reactive, disease-inducing Th1-cells from scid mice with colitis. *Clin Exp Immunol* 2003;131:34-40.
- 76 Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol* 2001;167:4245-4253.
- 77 MacDonald TT, Spencer J. Evidence that activated mucosal T cells play a role in the pathogenesis of enteropathy in human small intestine. *J Exp Med* 1988;167:1341–1349.
- 78 Lionetti P, Breese E, Braegger CP, Murch SH, Taylor J, MacDonald TT. T cell activation can induce either mucosal destruction or adaptation in cultured human fetal small intestine. *Gastroenterology* 1993;105:373–381.
- 79 Lionetti P, Spencer J, Breese EJ, Murch SH, Taylor J, MacDonald TT. Activation of mucosal Vb31 T cells and tissue damage in human small intestine by the bacterial superantigen, Staphylococcus aureus enterotoxin B. *Eur J Immunol* 1993;23:664–668.
- 80 Pender SL, Lionetti P, Murch SH, Wathen N, MacDonald TT. Proteolytic degradation of intestinal mucosal extracellular matrix following lamina propria T cell activation. *Gut* 1996;39:284–290.
- 81 Howie D, Spencer J, DeLord D, Pitzalis C, Wathen NC, Dogan A, Akbar A, MacDonald TT. Extrathymic T cell differentiation in the human intestine early in life. *J Immunol* 1998; 161:5862-5872.

- 82 O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-285.
- 83 Musso O, Rehn M, Saarela J, Theret N, Lietard J, Hintikka E, Lotrian D, Campion JP, Pihlajaniemi T, Clement B. Collagen XVIII is localized in sinusoids and basement membrane zones and expressed by hepatocytes and activated stellate cells in fibrotic human liver. *Hepatology* 1998;28:98-107.
- 84 Schuppan D, Cramer T, Bauer M, Strefeld T, Hahn EG, Herbst H. Hepatocytes as a source of collagen type XVIII endostatin. *Lancet* 1998;352:879-880.
- 85 Berseth CL. Gestational evaluation of small intestine motility in preterm and term infants. *J Pediatr* 1989;115:646-651.
- 86 Nanthakumar N, Meng D, Goldstein AM, Zhu W, Lu L, Uauy R, Llanos A, Claud EC, Walker WA. The mechanism of excessive intestinal inflammation in necrotizing enterocolitis: an immature innate immune response. *PLoS One* 2011;6:e17776.
- 87 Nankervis CA, Giannone PJ, Reber KM. The neonatal intestinal vasculature: contributing factors to necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatal* 2008;32:83-91.
- 88 Bister V, Salmela MT, Heikkilä P, Anttila A, Rintala R, Isaka K, Andersson S, Saarialho-Kere U. Matrilysins-1 and -2 (MMP-7 and -26) and metalloelastase (MMP-12), unlike MMP-19, are up-regulated in necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:60-66.
- 89 Kobayashi K, Arimura Y, Goto A, Okahara S, Endo T, Shinomura Y, Imai K. Therapeutic implications of the specific inhibition of causative matrix metalloproteinases in experimental colitis induced by dextran sulphate sodium. *J Pathol* 2006;209:376-383.
- 90 Wang YD, Wang W. Protective effect of ilomostat on trinitrobenzenesulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *World J Gastroenterol* 2008;14:5683-5688.
- 91 Aigner T, Neureiter D, Müller S, Küspert G, Belke J, Kirchner T. Extracellular matrix composition and gene expression in collagenous colitis. *Gastroenterology* 1997;113:136-143.
- 92 Lakatos G, Sipos F, Miheller P, Hritz I, Varga MZ, Juhasz M, Molnar B, Tulassay Z, Herszenyi L. The behavior of matrix metalloproteinase-9 in lymphocytic colitis, collagenous colitis and ulcerative colitis. *Pathol Oncol Res* 2012;18:85-91.
- 93 Daum S, Foss HD, Schuppan D, Riecken EO, Zeitz M, Ullrich R. Synthesis of collagen I in collagenous sprue. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:1232-1236.
- 94 Jun JI, Lau LF. Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nature Reviews* 2011;10:945-963.
- 95 McLennan SV, Wang XY, Moreno V, Yue DK, Twigg SM. Connective tissue growth factor mediates high glucose effects on matrix degradation through tissue inhibitor of matrix metalloproteinase type 1: implications for diabetic nephropathy. *Endocrinology* 2004;145:5646-5655.
- 96 Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Fujimoto M, Grotendorst GR, Takehara K. Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *J Invest Dermatol* 1996; 106:729-733.
- 97 Abou-Shady M, Friess H, Zimmermann A, di Mola FF, Guo XZ, Baer HU, Büchler MW. Connective tissue growth factor in human liver cirrhosis. *Liver* 2000;20:296-304.
- 98 Murphy M, Godson C, Cannon S, Kato S, Mackenzie HS, Martin F, Brady HR. Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells. *J Biol Chem* 1999;274:5830-5834.



- 99 Oemar BS, Werner A, Garnier JM, Do DD, Godoy N, Nauck M, März W, Rupp J, Pech M, Lüscher TF. Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. *Circulation* 1997;95:831–839.
- 100 Stahle-Bäckdahl M, Malm J, Veress B, Benoni C, Bruce K, Egesten A. Increased presence of eosinophilic granulocytes expressing transforming growth factor- $\beta$ 1 in collagenous colitis. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:742–746.
- 101 Taha Y, Raab Y, Larsson A, Carlson M, Löf L, Gerdin B, Thörn M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – A possible mediator of inflammation and mucosal permeability in patients with collagenous colitis. *Dig Dis Sci* 2004;49:109-115.
- 102 Tagkalidis PP, Gibson PR, Bhathal PS. Microscopic colitis demonstrates a T helper cell type 1 mucosal cytokine profile. *J Clin Pathol* 2007;60:382-387.
- 103 Mageto Y, Flaherty K, Brown A, Raghu G. Safety and tolerability of human monoclonal antibody FG-3019, anti-connective tissue growth factor, in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2004;126:773S.
- 104 Adler SG, Schwartz S, Williams ME, Arauz-Pacheco C, Bolton WK, Lee T, Li D, Neff TB, Urquilla PR, Sewell KL. Phase I study of anti-CTGF monoclonal antibody in patients with diabetes and microalbuminuria. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1420-1428.
- 105 Picozzi VJ, Pipas JM, Koong A, McMullen AD, Gadea P, Williams D, et al. FG-3019, a human monoclonal antibody to CTGF, with gemcitabine/erlotinib in patients with locally advanced or metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. ASCO 2013; Gastrointestinal Cancers Symposium, abstract # 213, San Francisco, CA, USA.
- 106 Brigstock DR. Strategies for blocking the fibrogenic actions of connective tissue growth factor (CCN2): from pharmacological inhibition in vitro to targeted siRNA therapy in vivo. *J Cell Commun Signal* 2009;3:5-18.
- 107 Salmela MT, MacDonald TT, Black D, Irvine B, Zhuma T, Saarialho-Kere U, Pender SL. Upregulation of matrix metalloproteinases in a model of T cell mediated tissue injury in the gut: analysis by gene array and in situ hybridization. *Gut* 2002;51:540-547.
- 108 Sziksz E, Pap D, Lippai R, Beres NJ, Fekete A, Szabo AJ, Vannay A. Fibrosis related inflammatory mediators: Role of the IL-10 cytokine family. *Mediators Inflamm* 2015; 2015:764641.
- 109 Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-274.
- 110 Beşer OF, Conde CD, Serwas N, Cokuğraş FC, Kutlu T, Boztuğ K, Erkan T. Clinical Features of Interleukin-10 Receptor Gene Mutations in Children With Very Early-onset Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015;60:332-338.
- 111 Uhlig HH, Schwerd T, Koletzko S, Shah N, Kammermeier J, Elkadri A, Ouahed J, Wilson DC, Travis SP, Turner D, Klein C, Snapper SB, Muise AM; COLORS in IBD Study Group and NEOPICS. The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2014;147:990-1007.
- 112 Lee CH, Hsu P, Nanan B, Nanan R, Wong M, Gaskin KJ, Leong RW, Murchie R, Muise AM, Stormon MO. Novel de novo mutations of the interleukin-10 receptor gene lead to infantile onset inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2014;8:1551-1556.
- 113 Shim JO, Seo JK. Very early-onset inflammatory bowel disease (IBD) in infancy is a different disease entity from adult-onset IBD; one form of interleukin-10 receptor mutations. *J Hum Genet* 2014;59:337-341.
- 114 Kotlarz D, Beier R, Murugan D, Diestelhorst J, Jensen O, Boztug K, Pfeifer D, Kreipe H, Pfister ED, Baumann U, Puchalka J, Bohne J, Egritas O, Dalgic B, Kolho KL, Sauerbrey A, Buderus S, Güngör T, Enninger A, Koda YK, Guariso G, Weiss B,

- Corbacioglu S, Socha P, Uslu N, Metin A, Wahbeh GT, Husain K, Ramadan D, Al-Herz W, Grimbacher B, Sauer M, Sykora KW, Koletzko S, Klein C. Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology* 2012;143:347-355.
- 115 Fedorak RN, Gangl A, Elson CO, Rutgeerts P, Schreiber S, Wild G, Hanauer SB, Kilian A, Cohard M, LeBeaut A, Feagan B. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. *Gastroenterology*. 2000;119:1473-1482.
- 116 Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, Wild G, Williams CN, Nikolaus S, Jacyna M, Lashner BA, Gangl A, Rutgeerts P, Isaacs K, van Deventer SJ, Koningsberger JC, Cohard M, LeBeaut A, Hanauer SB. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 2000;119:1461-1472.
- 117 del Carmen S, de Moreno de LeBlanc A, Perdigon G, Bastos Pereira V, Miyoshi A, Azevedo V, LeBlanc JG. Evaluation of the anti-inflammatory effect of milk fermented by a strain of IL-10-producing *Lactococcus lactis* using a murine model of Crohn's disease. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2011;21:138-146.
- 118 del Carmen S, Martín Rosique R, Saraiva T, Zurita-Turk M, Miyoshi A, Azevedo V, de Moreno de LeBlanc A, Langella P, Bermúdez-Humarán LG, LeBlanc JG. Protective effects of lactococci strains delivering either IL-10 protein or cDNA in a TNBS-induced chronic colitis model. *J Clin Gastroenterol* 2014;48 Suppl 1:S12-7.
- 119 Pender SL, Fell JM, Chamow SM, Ashkenazi A, MacDonald TT. A p55 TNF receptor immunoadhesin prevents T cell-mediated intestinal injury by inhibiting matrix metalloproteinase production. *J Immunol* 1998;160:4098-4103.
- 120 Di Sabatino A, Saarialho-Kere U, Buckley MG, Gordon JN, Biancheri P, Rovedatti L, Corazza GR, MacDonald TT, Pender SL. Stromelysin-1 and macrophage metalloelastase expression in the intestinal mucosa of Crohn's disease patients treated with infliximab. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:1049-1055.
- 121 de Bruyn M, Machiels K, Vandooren J, Lemmens B, Van Lommel L, Breynaert C, Van der Goten J, Staelens D, Billiet T, De Hertogh G, Ferrante M, Van Assche G, Vermeire S, Opdenakker G, Schuit F, Rutgeerts P, Arijs I. Infliximab restores the dysfunctional matrix remodeling protein and growth factor gene expression in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:339-352.
- 122 Gao Q, Meijer MJ, Schlüter UG, van Hogezaand RA, van der Zon JM, van den Berg M, van Duijn W, Lamers CB, Verspaget HW. Infliximab treatment influences the serological expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:693-702.
- 123 de Bruyn M, Arijs I, De Hertogh G, Ferrante M, Van Assche G, Rutgeerts P, Vermeire S, Opdenakker G. Serum Neutrophil Gelatinase B-associated Lipocalin and Matrix Metalloproteinase-9 Complex as a Surrogate Marker for Mucosal Healing in Patients with Crohn's Disease. *J Crohns Colitis* 2015; pii:jjv148.
- 124 Di Sabatino A, Pender SL, Jackson CL, Prothero JD, Gordon JN, Picariello L, Rovedatti L, Docena G, Monteleone G, Rampton DS, Tonelli F, Corazza GR, MacDonald TT. Functional modulation of Crohn's disease myofibroblasts by anti-tumor necrosis factor antibodies. *Gastroenterology* 2007;133:137-149.
- 125 León F, Roldán E, Sanchez L, Camarero C, Bootello A, Roy G. Human small-intestinal epithelium contains functional natural killer lymphocytes. *Gastroenterology* 2003;125:345-356.

- 126 Phillips JH, Hori T, Nagler A, Bhat N, Spits H, Lanier LL. Ontogeny of human natural killer (NK) cells: fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3 epsilon,delta proteins. *J Exp Med* 1992;175:1055-1066.
- 127 Wang B, Wang N, Whitehurst CE, She J, Chen J, Terhorst C. T lymphocyte development in the absence of CD3 epsilon or CD3 gamma delta epsilon zeta. *J Immunol* 1999;162:88-94.
- 128 Poggi A, Sargiacomo M, Biassoni R, Pella N, Sivori S, Revello V, Costa P, Valtieri M, Russo G, Mingari MC. Extrathymic differentiation of T lymphocytes and natural killer cells from human embryonic liver precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4465-4469.
- 129 Schmitz F, Tjon JM, Lai Y, Thompson A, Kooy-Winkelaar Y, Lemmers RJ, Verspaget HW, Mearin ML, Staal FJ, Schreurs MW, Cupedo T, Langerak AW, Mulder CJ, van Bergen J, Koning F. Identification of a potential physiological precursor of aberrant cells in refractory coeliac disease type II. *Gut* 2013;62:509-519.
- 130 Verbeek WH, von Blomberg BM, Coupe VM, Daum S, Mulder CJ, Schreurs MW. Aberrant T-lymphocytes in refractory coeliac disease are not strictly confined to a small intestinal intraepithelial localization. *Cytometry B Clin Cytom* 2009;76:367-374.
- 131 Malamut G, Afchain P, Verkarre V, Lecomte T, Amiot A, Damotte D, Bouhnik Y, Colombel JF, Delchier JC, Allez M, Cosnes J, Lavergne-Slove A, Meresse B, Trinquart L, Macintyre E, Radford-Weiss I, Hermine O, Brousse N, Cerf-Bensussan N, Cellier C. Presentation and long-term follow-up of refractory coeliac disease: comparison of type I with type II. *Gastroenterology* 2009;136:81-90.
- 132 Meresse B, Korneychuk N, Malamut G, Cerf-Bensussan N. Interleukin-15, a master piece in the immunological jigsaw of coeliac disease. *Dig Dis* 2015;33:122-130.
- 133 Al-Toma A, Verbeek WH, Hadithi M, von Blomberg BM, Mulder CJ. Survival in refractory coeliac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma: retrospective evaluation of single-centre experience. *Gut* 2007;56:1373-1378.
- 134 Muragaki Y, Timmons S, Griffith CM, Oh SP, Fadel B, Quertermous T, Olsen BR. Mouse *Col18a1* is expressed in a tissue-specific manner as three alternative variants and is localized in basement membrane zones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8763-8767.
- 135 Saarela J, Rehn M, Oikarinen A, Autio-Harmainen H, Pihlajaniemi T. The short and long forms of type XVIII collagen show clear tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in humans. *Am J Pathol* 1998;153:611-626.
- 136 Yamaguchi N, Anand-Apte B, Lee M, Sasaki T, Fukai N, Shapiro R, Que I, Lowik C, Timpl R, Olsen BR. Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *Embo J* 1999;18:4414-4423.
- 137 Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, Lu H, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:11721-11726.
- 138 Wickström SA, Alitalo K, Keski-Oja J. Endostatin associates with integrin alpha5beta1 and caveolin-1, and activates Src via a tyrosyl phosphatase-dependent pathway in human endothelial cells. *Cancer Res* 2002;62:5580-5589.
- 139 Kim YM, Hwang S, Kim YM, Pyun BJ, Kim TY, Lee ST, Gho YS, Kwon YG. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signalling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem* 2002;277:27872-27879.
- 140 Chen J, Liu DG, Yang G, Kong LJ, Du YJ, Wang HY, Li FD, Pei FH, Song JT, Fan YJ, Liu AY, Wang XH, Li BX. Endostar, a novel human recombinant endostatin, attenuates liver fibrosis in CCl4-induced mice. *Exp Biol Med* 2014;239:998-1006.

- 141 Kim YM, Jang JW, Lee OH, Yeon J, Choi EY, Kim KW, Lee ST, Kwon YG. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 2000;60:5410-5413.
- 142 Nyberg P, Heikkilä P, Sorsa T, Luostarinen J, Heljasvaara R, Stenman UH, Pihlajaniemi T, Salo T. Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell invasion and intravasation and blocks the activation of matrix metalloproteinase-2, -9, and -13. *J Biol Chem* 2003;278:22404-22411.
- 143 Felbor U, Dreier L, Bryant RA, Ploegh HL, Olsen BR, Mothes W. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *Embo Journal* 2000;19:1187-1194.
- 144 Wen W, Moses MA, Wiederschain D, Arbiser JL, Folkman J. The generation of endostatin is mediated by elastase. *Cancer Research* 1999;59:6052-6056.
- 145 Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, Delaisse J. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett* 2000;486:247-251.
- 146 Chang JH, Javier JA, Chang GY, Oliveira HB, Azar DT. Functional characterization of neostatins, the MMP-derived, enzymatic cleavage products of type XVIII collagen. *FEBS Lett* 2005;579:3601-3606.
- 147 Heljasvaara R, Nyberg P, Luostarinen J, Parikka M, Heikkilä P, Rehn M, Sorsa T, Salo T, Pihlajaniemi T. Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteinases. *Exp Cell Res* 2005;307:292-304.
- 148 Sund M, Kalluri R. Tumor stroma derived biomarkers in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:177-183.
- 149 Sheahan K, Shuja S, Murnane MJ. Cysteine protease activities and tumor development in human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1989;49:3809-3814.
- 150 Chauhan SS, Goldstein LJ, Gottesman MM. Expression of cathepsin L in human tumors. *Cancer Res* 1991;51:1478-1481.
- 151 Shuja S, Sheahan K, Murnane MJ. Cysteine endopeptidase activity levels in normal human tissues, colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* 1991;49:341-346.
- 152 De Stefanis D, Demoz M, Dragonetti A, Hourri JJ, Ogier-Denis E, Codogno P, Baccino FM, Isidoro C. Differentiation-induced changes in the content, secretion, and subcellular distribution of lysosomal cathepsins in the human colon cancer HT-29 cell line. *Cell Tissue Res* 1997;289:109-117.
- 153 te Velde EA, Reijerkerk A, Brandsma D, Vogten JM, Wu Y, Kranenburg O, Voest EE, Gebbink M, Borel Rinkes IH. Early endostatin treatment inhibits metastatic seeding of murine colorectal cancer cells in the liver and their adhesion to endothelial cells. *Br J Cancer* 2005;92:729-735.
- 154 Jia Y, Liu M, Huang W, Wang Z, He Y, Wu J, Ren S, Ju Y, Geng R, Li Z. Recombinant human endostatin Endostar inhibits tumor growth and metastasis in a mouse xenograft model of colon cancer. *Pathol Oncol Res* 2011;18:315-323.
- 155 Chen Z, Guo W, Cao J, Lv F, Zhang W, Qiu L, Li W, Ji D, Zhang S, Xia Z, Wang J, Li J. Endostar in combination with modified FOLFOX6 as an initial therapy in advanced colorectal cancer patients: a phase I clinical trial. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015;75:547-557.
- 156 Lu S, Li L, Luo Y, Zhang L, Wu G, Chen Z, Huang C, Guo S, Zhang Y, Song X, Yu Y, Zhou C, Li W, Liao M, Li B, Xu L, Chen P, Hu C, Hu C. A Multicenter, Open-Label, Randomized Phase II Controlled Study of rh-Endostatin (Endostar) in Combination with Chemotherapy in Previously Untreated Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2015;10:206-211.
- 157 Bao Y, Peng F, Zhou QC, Yu ZH, Li JC, Cheng ZB, Chen L, Hu X, Chen YY, Wang J, Wang Y, Ma HL, Xu ZM, Lu RB, Deng XW, Chen M. Phase II trial of recombinant

- human endostatin in combination with concurrent chemoradiotherapy in patients with stage III non-small-cell lung cancer. *Radiother Oncol* 2015;114:161-166.
- 158 Chen Y, Du Y, Li P, Wu F, Fu Y, Li Z, Luo Y. Phase I trial of M2ES, a novel polyethylene glycosylated recombinant human endostatin, plus gemcitabine in advanced pancreatic cancer. *Mol Clin Oncol* 2014;2:586-590.
- 159 Yin G, Liu W, An P, Li P, Ding I, Planelles V, Schwarz EM, Min W. Endostatin gene transfer inhibits joint angiogenesis and pannus formation in inflammatory arthritis. *Mol Ther* 2002;5:547-554.
- 160 Beecken WD, Engl T, Blaheta R, Bentas W, Achilles EG, Jonas D, Shing Y, Camphausen K. Angiogenesis inhibition by angiostatin, endostatin and TNP-470 prevents cyclophosphamide induced cystitis. *Angiogenesis* 2004;7:69-73.
- 161 Tolstanova G, Deng X, Khomenko T, Garg P, Paunovic B, Chen L, Sitaraman S, Shiloach J, Szabo S, Sandor Z. Role of anti-angiogenic factor endostatin in the pathogenesis of experimental ulcerative colitis. *Life Sciences* 2011;88:74-81.
- 162 Yamaguchi Y, Takihara T, Chambers RA, Veraldi KL, Larregina AT, Feghali-Bostwick CA. A peptide derived from endostatin ameliorates organ fibrosis. *Sci Transl Med* 2012;4:136ra71.

## 6 Danksagung

Bei allen Menschen, die mich über die Jahre meiner bisherigen akademischen Tätigkeit unterstützt und damit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken.

Insbesondere danke ich Herrn Professor Dr. Hermann Herbst und Herrn Professor Dr. Dr. Detlef Schuppan sehr herzlich für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die Vermittlung von Begeisterung am wissenschaftlichen Arbeiten.

Mein großer Dank gilt Herrn Professor Thomas T. MacDonald, in dessen Labor in Southampton ich eine Post-doc Stelle innehatte. Professor MacDonald verstand es, einen stets mit seinem schottischen Humor zu motivieren.

Meinem ersten Klinikchef, Herrn Professor Dr. Ernst-Otto Riecken, möchte ich für die klinische Ausbildung herzlich danken.

Mein großer Dank gilt Herrn Professor Dr. Martin Zeitz, der mich nach der Zeit in England wieder in seine Abteilung aufgenommen hat. Ich danke ihm für das Interesse an meiner Arbeit und für seine Unterstützung und Förderung in klinischer Hinsicht. Insbesondere danke ich ihm, dass ich all die Jahre in der Endoskopie zubringen durfte.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Frau Professor Dr. Britta Siegmund, die meine Habilitationsarbeit zuletzt betreuend übernommen hat, für die sehr nette Zusammenarbeit und Korrektur der Habilitationsschrift.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei meinen Kollegen der Endoskopie und insbesondere bei Herrn Privatdozent Dr. Christian Bojarski für die sehr kollegiale und gute wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Schließlich danke ich von Herzen meiner Familie und Freunden, ohne deren Rückhalt diese Arbeit nicht entstanden wäre.

## 7 Eidesstattliche Erklärung

Nach § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- ich weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet habe,
- ich die vorliegende Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben habe und
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Berlin, den 14.10.2015

(Dr. med. Ute Günther)