

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**CCR4-abhängige Migration regulatorischer T-Zellen
bei Morbus Crohn**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Adriane Julia Reichhardt

aus Berlin

Gutachter/in: 1.: Prof. Dr. med. M. Zeitz
 2.: Prof. Dr. rer. nat. A. Thiel
 3.: Prof. Dr. med. A. Stallmach

Datum der Promotion: 22.03.2013

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	5
1.1	Das Krankheitsbild Morbus Crohn.....	5
1.1.1	Epidemiologie, Klinik, Diagnostik, Therapie.....	5
1.1.2	Pathophysiologie: Genetik, Umwelt, Immunologie	8
1.2	T-Zellen.....	10
1.2.1	T-Helfer-Zellen.....	11
1.2.2	Th17-Zellen	12
1.3	Regulatorische T-Zellen	13
1.3	Chemokine und Oberflächenstrukturen.....	17
1.4	Genexpressionsprofil	17
2	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	19
3	Material und Methoden.....	20
3.1	Probanden	20
3.2	Laborartikel.....	21
3.2.1	Puffer, Lösungen, Medien.....	21
3.2.2	Sonstige Reagenzien und Chemikalien.....	22
3.2.3	Verbrauchsmaterialien.....	23
3.2.4	Geräte	23
3.2.5	Antikörper	24
3.3	Zellbiologische Methoden	25
3.3.1	Isolierung der Leukozyten aus peripherem Blut.....	25
3.3.2	Isolierung der Leukozyten aus mesenterialen Lymphknoten.....	25
3.3.3	Zellzählung	26
3.3.4	Zellsortierung	26
3.3.5	Reinheit der CD4 ⁺ -Sortierung.....	27
3.4	Migrationsassay.....	28
3.4.1	Beschichtung der Transwells mit Kollagen	29
3.4.2	Migrationsmedium	29
3.5	Durchflusszytometrie	30
3.5.1	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	30
3.5.2	FACS-Zählung mittels Beads	32
3.5.3	Oberflächenfärbung	33
3.5.4	Intrazelluläre FOXP3-Färbung	34
3.6	Statistische Auswertung.....	34

4 Ergebnisse	35
4.1 Oberflächencharakterisierung der T-Zellen des peripheren Blutes und mesenterialer Lymphknoten bei Morbus Crohn und gesunden Kontrollen	35
4.1.1 CD4- und FOXP3- Expression	35
4.1.2 CD62L-Expression	36
4.1.3 CCR4-Expression.....	37
4.1.4 Alpha4 Beta7-Expression	40
4.1.5 CD45RA-Expression.....	41
4.1.6 Unterschiede im Expressionsniveau von FOXP3	43
4.2 Migrationsversuche	46
4.2.1 Induktion von FOXP3 oder CCR4 durch TARC	47
4.2.2 Migration von CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ T-Zellen bei Morbus Crohn und Gesunden	48
4.2.3 Vergleich der Migration vor und nach der Infusion mit Infliximab (IFX).....	49
5 Diskussion	53
5.1 Unterschiede im Phänotyp von T-Zellen bei Morbus Crohn versus Gesunden.....	53
5.2 Verminderte Migration regulatorischer T-Zellen bei Morbus Crohn.....	58
5.2.1 Migrationsversuche vor und nach Infliximab-Infusion	59
5.3 Methodendiskussion	60
5.4 Schlussfolgerung und Ausblick	61
5.4.1 Therapie mit regulatorischen T-Zellen	61
Zusammenfassung.....	63
Abkürzungsverzeichnis	65
Literaturverzeichnis	67
Danksagung	73
Lebenslauf.....	74
Eidesstattliche Erklärung.....	75

1 Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild Morbus Crohn

Unter dem Begriff der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) werden vor allem die beiden Entitäten Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zusammengefasst (Wittig und Zeitz 2001).

Morbus Crohn (Synonyme: Ileitis terminalis/regionalis oder Enterocolitis regionalis granulomatosa) ist eine chronisch rezidivierende, meist schubförmig verlaufende granulomatöse Entzündung, die den gesamten Gastrointestinaltrakt befallen kann (Michetti u. a. 2007).

1.1.1 Epidemiologie, Klinik, Diagnostik, Therapie

Epidemiologie:

In Europa leiden 150-200 von 100.000 Menschen zwischen 15 und 64 Jahren an Morbus Crohn (Michetti u. a. 2007). Weltweit ist ein Nord-Süd-Gefälle sowie ein geringeres West-Ost-Gefälle zu beobachten, die Inzidenz ist in industrialisierten Regionen erhöht. Das Verhältnis von Frauen und Männern unterscheidet sich unwesentlich. Häufig vergeht eine lange Zeitspanne zwischen der Erstmanifestation und der Diagnosestellung (Karlinger u. a. 2000).

Klinik:

Typisch für die klinische Symptomatik des Morbus Crohn sind rezidivierende, kolikartige Bauchschmerzen, die häufig im rechten Unterbauch lokalisiert sind und chronische, nicht blutige Diarrhoen mit variabler Stuhlfrequenz. Darüber hinaus kann es zu unspezifischen Symptomen wie Appetitlosigkeit, Übelkeit, Abgeschlagenheit, Fieber und Gewichtsverlust kommen. Bei pädiatrischen Patienten ist das klassische Bild mit Bauchschmerzen, Durchfall und Gewichtsverlust meistens nicht eindeutig ausgeprägt. Den systemischen Charakter des Morbus Crohn verdeutlicht das gehäufte Auftreten (50 - 60% der Patienten) von extraintestinalen Manifestationen (Nikolaus und Schreiber

2007). Diese können der Erstmanifestation des Morbus Crohn um Monate bis Jahre vorausgehen (Rothfuss u.a. 2006).

Morbus Crohn verläuft meist (80%) schubförmig, wobei Rezidive in 30% der Fälle nach einem und in 40% nach zwei Jahren auftreten. Einen chronisch aktiven Verlauf zeigen etwa 20% der Erkrankten (Michetti u. a. 2007).

Im Gegensatz zur Colitis ulcerosa kann die Erkrankung den gesamten Gastrointestinaltrakt betreffen. Beim Morbus Crohn lassen sich endoskopisch ein diskontinuierliches Befallsmuster und tiefe longitudinale Ulzera erkennen.

Beim Morbus Crohn ist vor allem das terminale Ileum und das proximale Kolon involviert (Nikolaus und Schreiber 2007). In den meisten Fällen wird ein gemeinsamer Befall von Ileum und Kolon (40 - 45%) festgestellt (Michetti u. a. 2007).

Komplikationen des Morbus Crohn treten durch die Entzündung, Malabsorption aber auch im Rahmen der Therapie auf. Fistelbildungen (kutan, enteroenterisch, enterovesikal, enterovaginal, peranal oder rektal) stehen an erster Stelle der Komplikationen des Morbus Crohn. An zweiter Stelle der Komplikationshäufigkeiten stehen Stenosen und intra- oder retroperitoneale Abszesse. Als Folge sind chirurgische Interventionen bei ca. 70% der Erkrankten mindestens einmal im Verlauf nötig. Dagegen kommen Perforationen oder lebensbedrohliche Blutungen selten vor. Bei Befall des Kolons beobachtet man ein leicht erhöhtes Risiko für die Ausbildung eines Kolonkarzinoms (Kamiya u. a. 2012). Als Komplikation der Malabsorption kann es neben einer Vitamin-Defizienz (vor allem Folsäure und Vitamin B12) auch gehäuft zu einer Cholelithiasis oder Nephrolithiasis kommen. Durch eine prolongierte Steroidtherapie ist das Osteoporoserisiko erhöht.

Diagnostik:

Die Diagnostik des Morbus Crohn besteht in der Erhebung einer Anamnese, dem klinischen Erscheinungsbild, laborchemischen sowie radiologischen, endoskopischen und histologischen Untersuchungen. Auszuschließen sind Darmentzündungen durch pathogene Keime (Nikolaus und Schreiber 2007).

Als Marker für die entzündliche Aktivität wird in der klinischen Routine meist das C-reaktive Protein (CRP) bestimmt, das meist im akuten Krankheitsschub erhöht ist. Bei chronisch aktiver Erkrankung ist häufig eine mikrozytäre Anämie zu diagnostizieren, bei

einer Malabsorption von Vitamin B12 im Ileum und/oder Folsäuremangel kann es zu einer makrozytären Anämie kommen.

Der abdominale Ultraschall wird als erste apparative Basisuntersuchung durchgeführt. Invasiver ist die Ileokoloskopie, bei der Biopsien aus Dünn- und Dickdarmsegmenten entnommen werden können. Makroskopisch zeigt der Morbus Crohn neben Schleimhautläsionen und fleckigen Rötungen im aktiven Stadium Ulzerationen, Fissuren, Fisteln und auch Stenosen. Entzündete und nicht entzündete Mukosa wechseln sich ab.

Eine erweiterte Dünndarmbeurteilung durch CT-, MR-Enterografie oder Kapselendoskopie ist hilfreich. Die Kontrastmitteluntersuchung lässt Stenosen und Fisteln erkennen und ist hilfreich für deren Lokalisation. Bei Verdacht auf einen Darmverschluss (Ileus) und/oder einer Darmperforation sollte eine Abdomenleeraufnahme durchgeführt werden.

Das histopathologische Korrelat des Morbus Crohn ist eine diskontinuierliche chronische mukosale Entzündung mit Epitheloidzellgranulomen (Lymphozytose und Plasmazellen). Alle Wandschichten können davon betroffen sein (transmural) und oft sind kleine, tiefe, teilweise aphthoide Ulzerationen zu finden. Typisch ist dabei eine starke regenerative Hyperplasie der Mukosa, die ödematös oder fibrotisch erscheint (Nikolaus und Schreiber 2007). Der histopathologische Befund weicht häufig vom endoskopischen Bild ab (Riphaus u. a. 2008).

Die Aktivität der Erkrankung kann durch verschiedene Indices bestimmt werden.

Beim Crohn's Disease Activity Index (CDAI) nach Best (Best u. a. 1976) handelt es sich um eine subjektive Beschwerdebeurteilung durch den Patienten sowie objektive Parameter, die durch den behandelnden Arzt erfasst werden.

Der Harvey-Bradshaw-Index (HBI) (Harvey und Bradshaw 1980) ist ein Index, der sich am CDAI orientiert, aber nur klinische Parameter beinhaltet (William R Best 2006).

In der klinischen Klassifikation von Montreal wird das Befallsmuster, das Patientenalter und der Verlauf (fistulierend oder stenosierend) stärker betont. Diese Klassifikation (s. Tab. 1) dient der standardisierten Phänotypisierung von Patienten mit Morbus Crohn (Silverberg u. a. 2005).

Einleitung

Klassifikation	Erläuterung
Alter bei Diagnose	A1: < 16 Jahre bei Diagnose A2: > 17-40 Jahre A3: > 40 Jahre
Lokalisation	L1: Terminales Ileum L2: Kolon L3: Ileokolon L4: Oberer Gastrointestinaltrakt L4+: Unterer Gastrointestinaltrakt und distale Erkrankungen
Verlauf	B1: Nicht strikturierend, nicht penetrierend B2: Strikturierend B3: Intern penetrierend B3p: Perianal penetrierend
Zusätzlich erfasst werden: Geschlecht, ethnische Zugehörigkeit, Familienanamnese für CED und extraintestinale Manifestationen.	

Tabelle 1: Montreal-Klassifikation für Morbus Crohn nach Silverberg.

Therapie:

Trotz intensiver Forschungsbemühungen ist zum derzeitigen Zeitpunkt eine kausale Therapie des Morbus Crohn nicht möglich.

Systemische Steroide spielen insbesondere im akuten Krankheitsschub eine wichtige Rolle. Die am häufigsten für die dauerhafte Entzündungskontrolle im Rahmen einer Langzeittherapie eingesetzte Medikamentengruppe bilden Immunsuppressiva (6-Mercaptopurin, Azathioprin und Methotrexat) sowie Biologika. Als Biologika ist aktuell nur der Antikörper gegen den Tumor-Nekrose-Faktor alpha (Infliximab; Adalimumab) zugelassen (Hoffmann und Zeitz 2002).

1.1.2 Pathophysiologie: Genetik, Umwelt, Immunologie

Als mögliche Ursachen der Erkrankungsentstehung werden heutzutage immunologische Prädispositionen, diverse Umwelteinflüsse und Veränderungen der intestinalen mikrobiellen Mikrobiota diskutiert (Scaldaferri und Fiocchi 2007) (s. Abb. 1).

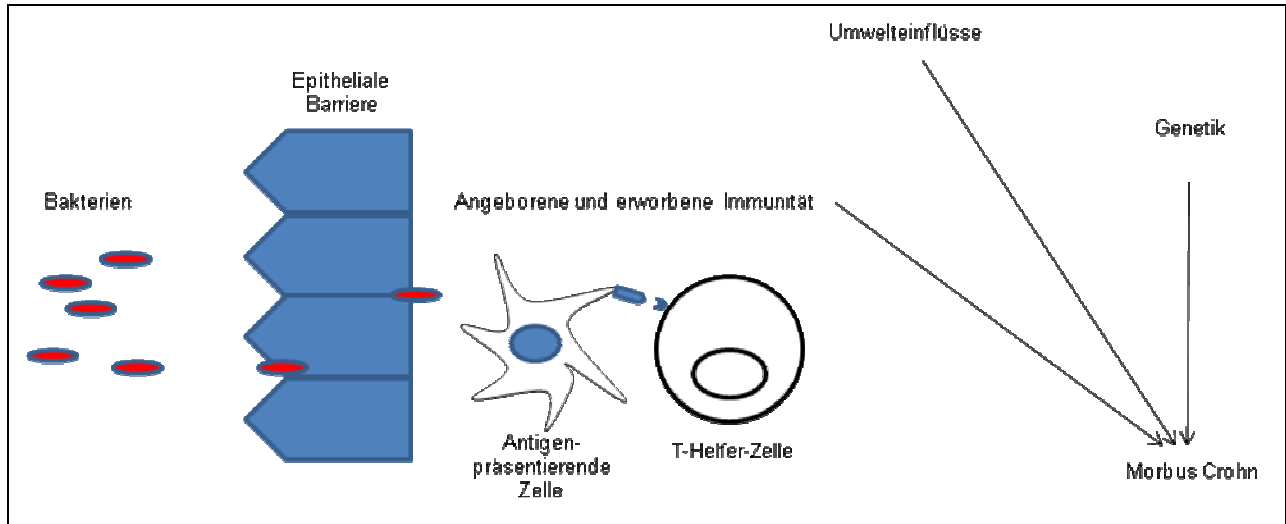


Abbildung 1:

Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankung nach Podolsky 2002.

Normales Epithel bildet eine effektive Barriere gegen luminale Pathogene.

Bei Morbus Crohn ist diese Barriere gestört. In Folge dessen können Bakterien direkt in Kontakt mit Immunzellen treten und eine lokale Entzündung initiieren. Die dabei ausgelöste proinflammatorische Kaskade führt zur Zytokin-vermittelten Differenzierung und Aktivierung von Immunzellen. Charakteristischerweise kommt es bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durch Störung der Regulationsmechanismen zu einer Chronifizierung der Erkrankung.

Genetik:

Mit der Entdeckung einer Funktionsverlustmutation in dem zytosolischen Rezeptor NOD2/CARD15 konnte erstmals für Morbus Crohn ein Zusammenhang zwischen erblichen Faktoren und Antigenen im Darmlumen dargelegt werden (Ogura u. a. 2001). Die NOD-Rezeptoren sind Teil der angeborenen Immunantwort. Mutationen bewirken eine unkontrollierte Stimulation des Transkriptionsfaktors NF κ B, was zu einer verstärkten Bildung proinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6, IL-12) führt (Eckmann und Karin 2005).

Heute sind genetische Polymorphismen (Genvarianten) an mehr als 70 Orten im Genom (Genloci) von Morbus Crohn Patienten identifiziert (Franke u. a. 2010).

Umwelt:

Es scheint, dass eine Reihe von Lebensstilen und Umweltfaktoren den Morbus Crohn mit bedingen, wobei Rauchen als stärkster Risikofaktor gilt. Diäten und Drogen sowie mehrfach ungesättigte Fettsäuren können die Krankheit negativ beeinflussen. Nach der „Hygiene-Theorie“ treten CED in Gegenden mit sehr guten hygienischen Standards vermehrt auf (Baumgart und Carding 2007).

Immunologie:

Ein intaktes Darmepithel setzt eine effektive Barrierefunktion mit einer Schleimproduktion, Sekretion von Immunglobulin A, einer Glykokalyx und Darmperistaltik voraus. Der gerichtete Transport bestimmter Nahrungsbestandteile wird durch dichte Zellverbindungen (Tight Junctions) und spezifische Kanäle gesteuert. Bei Störung dieser Barriere können luminal Antigenen in die Mukosa gelangen und Entzündungsreaktionen hervorrufen. Die Barriestörung bei CED bewirkt einen Übergang von einem toleranzerhaltenden in einen aktivierten Zustand des erworbenen Immunsystems mit B- und T-Lymphozyten-Aktivierung und deren Produktion von Immunglobulinen (Amsen u.a. 2009) (s. Abb. 1).

Vor allem die Funktion der T-Zellen scheint bei Morbus Crohn gestört zu sein. Möglicherweise wird die chronische Entzündung durch ein Ungleichgewicht regulatorischer T-Zellen zu Effektorzellen mit bedingt (Maul u. a. 2005).

1.2 T-Zellen

T-Zellen steuern eine effiziente, geordnete Immunabwehr. Sie koordinieren und aktivieren weitere Abwehrzellen.

T-Zellen unterliegen einem speziellen Entwicklungsprozess in drei Abschnitten:

Die T-Lymphozyten wandern aus dem Knochenmark in den Thymus (primär lymphatisches Organ). Dort exprimieren sie ihren spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR).

Es besteht ein großes Repertoire dieses Rezeptors.

Nach der TCR-Bildung werden die Rezeptoren CD4 oder CD8 (engl.: cluster of differentiation, Unterscheidungsmerkmal) von der T-Zelle exprimiert.

Eine weitere Differenzierung erfolgt nach Erkennung von MHC-Molekülen (engl.: major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex) in Kombination mit CD4

oder CD8. CD4⁺ Zellen werden T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) genannt, während CD8⁺ Zellen als zytotoxisch beschrieben werden, da sie in der Lage sind, direkt andere Zellen durch Aktivierung der Apoptose zu eliminieren (Janeway 2002, Immunologie, 5. Auflage). Auch für die Regulation des Transkriptionsfaktors FOXP3 (s. Abschnitt regulatorische T-Zellen) sind der TCR und die MHC-Moleküle bei der Differenzierung von T-Zellen wichtig (Ohkura und Sakaguchi 2010).

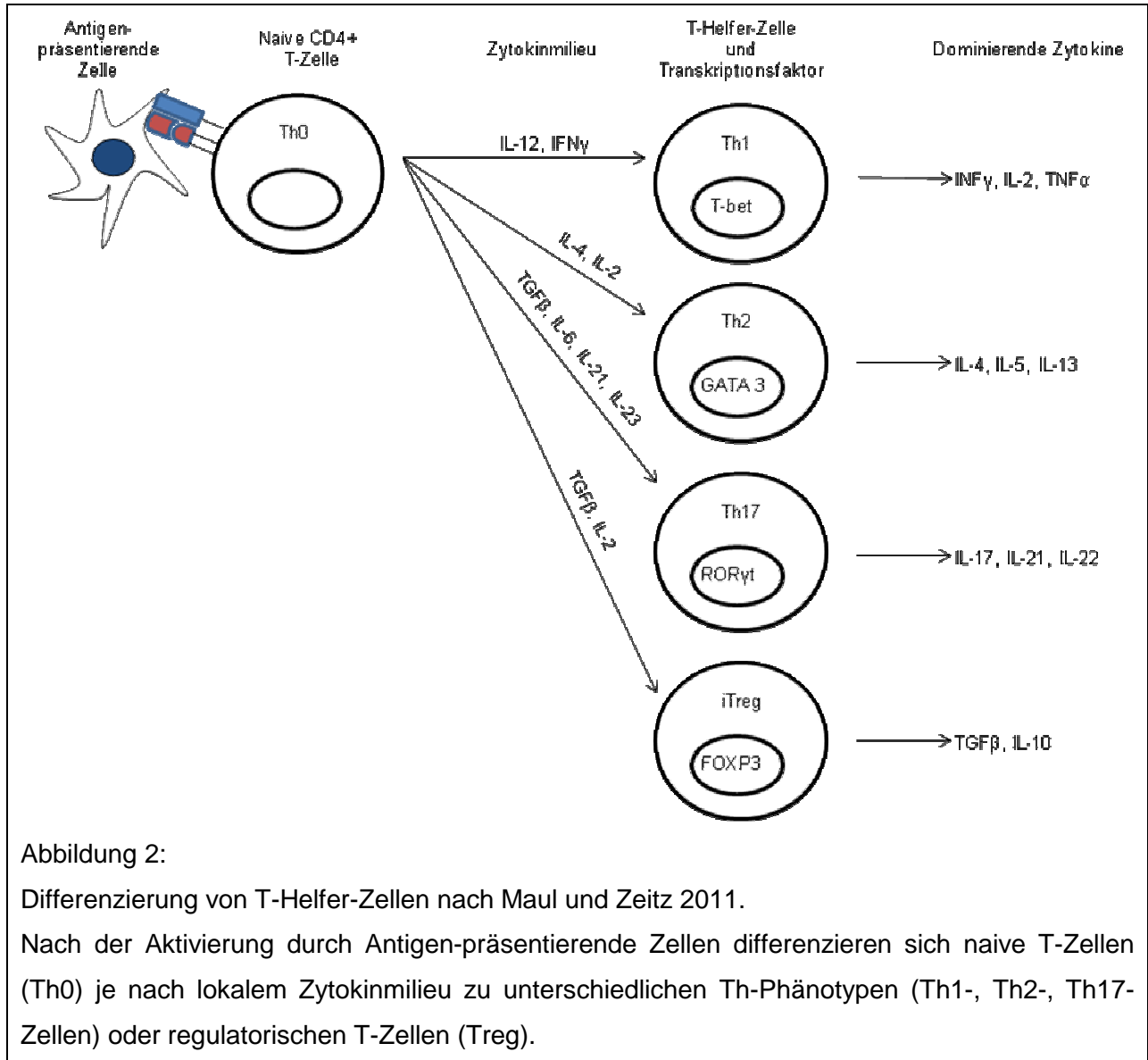
Der positiven Selektion wird eine negative Selektion im Thymus angeschlossen, die verhindert, dass T-Zellen körpereigene Strukturen angreifen (Alberts 2005, Lehrbuch der molekularen Zellbiologie, 3. Auflage).

Treffen Th-Zellen in der Peripherie auf ihr spezifisches Antigen und erhalten gleichzeitig positive kostimulatorische Signale, so differenzieren sie sich in Abhängigkeit vom lokalen Zytokinmilieu und der Art des Erregers zu distinkten T-Effektorzellen. Nach Beseitigung des Erregers bilden sich langlebige T-Gedächtniszellen, die bei erneuter Exposition eine rasche Reaktion erlauben.

1.2.1 T-Helfer-Zellen

Naive T-Zellen können sich zu verschiedenen T-Helfer- Phänotypen differenzieren (Th1-, Th2- und Th17-Zellen) (s. Abb. 2). Th1-Zellen produzieren neben anderen Zytokinen, vor allem Interferon gamma (INF γ) und Interleukin 2 (IL-2) (Holtmann 2002). Dies regt Makrophagen zur Sekretion proinflammatorische Zytokine (v.a. IL-1, IL-6 und IL-12) und des Tumor-Nekrose-Faktors alpha (TNF α) an. Den Th1-Zellen wird eine maßgebliche Beteiligung bei der Bekämpfung intrazellulärer Pathogene zugeschrieben. Th-2 Zellen produzieren vor allem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 und spielen eine wichtige Rolle bei der humoralen Abwehr (Janeway 2002, Immunologie, 5. Auflage).

Einleitung



1.2.2 Th17-Zellen

IL-6 und Transforming Growth-Faktor beta (TGF β) beeinflussen die Differenzierung naiver T-Zellen in Th17-Zellen. Th17-Zellen produzieren Interleukin 17, welches die Bildung von IL-1 und TNF α induziert (Ivanov u. a. 2006). Die Funktion regulatorischer T-Zellen wird hierdurch inhibiert (Miossec u.a. 2009). Th17-Zellen spielen somit eine Rolle bei Entzündungsreaktionen, Gewebedefekten und autoimmunen Prozessen. Sie wurden auch in der entzündeten Mukosa von Morbus Crohn-Patienten gefunden (Hovhannisyanyan u. a. 2011).

1.3 Regulatorische T-Zellen

Schon 1970 wurden T-Zellen beschrieben, die Immunreaktionen nicht nur verstärken, sondern auch herunter regulieren können (Gershon und Kondo 1970).

Regulatorische T-Zellen sind im peripheren Blut sowie in sekundär lymphatischen Organen als auch in entzündlichem Gewebe vertreten und haben lokale und systemische regulierende Eigenschaften auf andere Zellpopulationen (Cuadrado 2009). Sakaguchi und Mitarbeitern gelang es 1995, eine eigene Subpopulation von CD4⁺ T-Zellen im Mausmodell mit regulatorischen Eigenschaften zu isolieren, die als regulatorische T-Zellen (Tregs) beschrieben wurden. Zunächst wurden diese Zellen durch die Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptors) charakterisiert (Sakaguchi u. a. 1995).

Das CD25-Molekül, die α -Kette des IL-2-Rezeptors, wird allerdings auch von aktivierten nicht regulatorischen T-Zellen exprimiert. Außerdem können regulatorische T-Zellen je nach Aktivitätsstatus CD25 hoch- oder herunter regulieren (Corthay 2009).

Die Identifizierung von FOXP3 im Jahre 2001 als für regulatorische T-Zellen spezifischen Transkriptionsfaktor war ein großer Fortschritt bei der Charakterisierung dieser Zellpopulation (Brunkow u. a. 2001).

Heutzutage werden regulatorische T-Zellen durch weitere Marker (vor allem Rezeptoren) charakterisiert. Dazu zählen u.a. CD3, CTLA-4 (CD152) und GITR (Epple u. a. 2006).

Die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle durch regulatorische T-Zellen wurde in dieser Arbeit bei Morbus Crohn-Patienten und gesunden Probanden im peripheren Blut und auch in Zellen mesenterialer Lymphknoten verglichen (s. Tab. 2).

Marker	Funktion	Quelle
CD4 FOXP3	Charakterisierung regulatorischer T-Zellen (in dieser Arbeit aus technischen Gründen auf diese beiden Marker beschränkt)	(Saruta u. a. 2007)
CD62L	Zirkulieren und Einwandern in sekundär lymphatische Organe, spezifische Lymphozytenmigration	(Fu u. a. 2004)

CCR4	Rezeptor für TARC und MDC, spezifische Lymphozytenmigration	(Yuan u. a. 2007)
$\alpha 4\beta 7$	Spezifische Lymphozytenmigration, Bindung an MadCAM im Darm	(Wang u. a. 2010)

Tabelle 2: Oberflächenmoleküle regulatorischer T-Zellen, die deren spezifische Migration in entzündetes Gewebe bei Morbus Crohn beeinflussen.

Regulatorische T-Zellen besitzen die Fähigkeit, andere Zellen, vor allem Th-Zellen, in ihrer Funktion und Aktivität zu beeinflussen. Dadurch sind sie in der Lage, die immunologische Homöostase des Organismus aufrecht zu erhalten und damit überschießende Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen zu verhindern (Sakaguchi u.a. 2007).

Eine Mutation des FOXP3-Gens führt zu den IPEX-Immundefekten (Immunfehlregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie und X-linked Syndrom). Auch das XLAAD-Syndrom (X-abhängige Autoimmunität, allergisches Dysregulationssyndrom) wird mit Mutationen im FOXP3-Gen in Verbindung gebracht (Chatila u. a. 2000). Im Vordergrund stehen dabei Allergien, chronisch entzündliche Erkrankungen (auch CED) und Autoimmunprozesse in endokrinen Organen (Hori u.a. 2003).

Es zeigte sich, dass murine CD4⁺CD25⁺ T-Zellen die Proliferation von CD4⁺ Zellen unterdrücken können (Groux u. a. 1997). Außerdem vermittelten diese Zellen im Mausmodell chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine protektive Funktion (Read u.a. 2000). Hier sind sie sogar in der Lage, eine bestehende Kolitis zu heilen (Mottet u.a. 2003). Der supprimierende Effekt von regulatorischen T-Zellen war in Mausmodellen erst im späteren Krankheitsstadium der Kolitis zu erkennen. Es wird deshalb angenommen, dass diese Zellen die Chronifizierung zu verhindern vermögen (Powrie 2004).

Der genaue Effektormechanismus regulatorischer T-Zellen ist noch immer nicht vollständig aufgeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass regulatorische T-Zellen sowohl durch Zell-zu-Zell-Kontakt als auch durch Zytokine (z.B. IL-10 und TGF β) ihre immunmodulierende Wirkung entfalten (Holmén u. a. 2006) (s. auch Abb. 2).

Einleitung

Regulatorische T-Zellen sind in der Literatur bei verschiedenen Erkrankungen beschrieben, die den Darm betreffen. Dabei zeigte sich, dass regulatorische T-Zellen bei den meisten chronischen Erkrankungen in ihrer Anzahl gegenüber Gesunden vermindert sind.

Als normale Entzündungsantwort kann die erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit Divertikulitis angesehen werden (Maul u. a. 2005).

Regulatorische T-Zellen sind im peripheren Blut von Patienten mit CED während eines Entzündungsschubs vermindert, während die Anzahl bei Entzündungskontrollen (Divertikulitispatienten) hochreguliert wird. Auch sind im Darm von Morbus Crohn-Patienten weniger regulatorische T-Zellen vorhanden als bei entzündlichen Kontrollen. Dabei konnten keine funktionalen suppressiven Defekte der regulatorischen T-Zellen festgestellt werden. Es wird angenommen, dass die Migration regulatorischer T-Zellen zum Ort der Entzündung bei Morbus Crohn vermindert ist (Maul u. a. 2005).

Veränderte Verhältnisse regulatorischer T-Zellen sind bei Darmerkrankungen auch in mesenterialen Lymphknoten beschrieben worden (s. Tab. 3).

	CED aktiv	DIV	GvHD	GvHD unterTherapie (ansprechend)	CMV- Kolitis	GI- Infekt	HIV
Regulatorische T-Zellen in intestinalen Biopsaten	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↑

Tabelle 3: Anteil regulatorischer T-Zellen bezogen auf die gemessene CD4⁺ T-Zell-Population bei verschiedenen Erkrankungen, die den Darm betreffen.

↑ gesteigert, ↓ vermindert

In Darmbiopsien weisen gesunde Personen ein ausgewogenes Verhältnis von regulatorischen T-Zellen und Effektorzellen auf (Rieger u. a. 2006).

Bei Divertikulitis sowie bei der CMV-Kolitis unter Immunsuppression sind regulatorische T-Zellen in den Biopsien vermehrt. Patienten in einem akuten Schub von Morbus Crohn

weisen einen anscheinend zu geringen Anstieg regulatorischer T-Zellen im Verhältnis zu den Effektorzellen am entzündeten Darmabschnitt auf (Maul u. a. 2005).

In Biopsien von Patienten mit einer Graft-versus-Host-Reaktion (GvHD), einer Reaktion von Lymphozyten des Spenders gegen Antigene des Empfängers, ist keine Erhöhung regulatorischer T-Zellen festzustellen. Es ist demnach ein Verlust der immunologischen Regulation anzunehmen. Dagegen scheint bei transplantierten Patienten ohne GvHD-Symptomatik aber mit intestinalen Beschwerden (mit gastrointestinalem Infekt) die Regulation stattzufinden, da hier eine hohe Anzahl regulatorischer T-Zellen im Darm zu finden ist (Rieger u. a. 2006).

Verlaufsergebnisse aus Darm-Biopsaten bei GvHD zeigen deutlich, dass die Anzahl und damit das Verhältnis regulatorischer T-Zellen zu Effektorzellen zur Krankheit beitragen. Entwickelten Patienten im Verlauf nach einer Transplantation eine GvHD, konnte auch ein Abfall regulatorischer T-Zellen im Verhältnis zu CD8⁺ Zellen festgestellt werden. Sprachen Patienten mit GvHD auf die Therapie an, konnte ein Anstieg regulatorischer T-Zellen im Verhältnis zu CD8⁺ Zellen gesehen werden. Bei Patienten, die nicht auf die Therapie ansprachen, zeigten die Untersuchungen keine steigenden Zahlen der regulatorischen T-Zellen (Rieger u. a. 2006).

Auch bei Patienten mit HIV (Humanes Immundefizienz-Virus) können veränderte Verhältnisse regulatorischer T-Zellen im Vergleich zu Gesunden festgestellt werden.

Bei HIV waren in der Darmmukosa mehr als ein Drittel aller CD4⁺ Zellen regulatorische T-Zellen. Eine hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) zeigte einen Rückgang regulatorischer T-Zellen im Darm hin zu einem Level von Gesunden (Epple u. a. 2006). Möglicherweise unterdrücken regulatorische T-Zellen bei HIV die Immunantwort auf das Virus und auf andere Pathogene, was Erkrankungen durch opportunistische Erreger erhöht (Epple u. a. 2006).

Genau differenziert werden konnte bisher weder für GvHD noch für Morbus Crohn, ob die Imbalance regulatorischer T-Zellen zu Effektorzellen an einer ungenügenden Steigerung der Anzahl regulatorischer T-Zellen, an einem vermehrten kontrollierten Zelltod (Apoptose) oder an einer unzureichenden Migration dieser Zellpopulation liegt (Rieger u. a. 2006) (Maul u. a. 2005).

1.3 Chemokine und Oberflächenstrukturen

Chemokine:

Chemokine sind eine Gruppe chemotaktischer Zytokine, die die spezifische Migration von Leukozyten steuern (Iellem u. a. 2001). Alle Chemokine besitzen ähnliche Aminosäuresequenzen. Die Einteilung erfolgt in zwei große Gruppen (C-C-Chemokine und C-X-C-Chemokine) anhand der Cysteine im aminoterminalen Bereich.

Die C-C-Chemokine CCL17 (ältere Bezeichnung TARC; Thymus and activation regulated chemokine) und CCL22 (MDC; Macrophages-derived chemokine) wurden bei Patienten mit Morbus Crohn am Ort der Entzündung vermehrt produziert.

Beide Chemokine beeinflussen gezielt die Zellmigration von Lymphozyten in sekundär lymphatische Organe (Iellem u. a. 2001).

Chemokinrezeptor CCR4:

CCR4 ist der spezifische Rezeptor für die Liganden TARC und MDC. CCR4 wird auf regulatorischen T-Zellen und Th-Zellen exprimiert (Iellem u. a. 2001) und ist dabei nicht nur, wie zuerst angenommen, für die Migration in die Haut notwendig. In Mausmodellen konnte CCR4 auch auf regulatorischen T-Zellen in der Lunge und im Darm nachgewiesen werden. CCR4 wird daher als wichtiger Rezeptor für die spezifische Migration von regulatorischen T-Zellen angesehen (Yuan u. a. 2007).

1.4 Genexpressionsprofil

Microarrays, auch „Genchips“ genannt, sind molekulare Untersuchungssysteme. Sie dienen zur Erstellung von Genexpressionsprofilen- Muster von aktiven Genen (Pfoertner u. a. 2006).

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. med. Buer des deutschen Forschungszentrums für Biotechnologie in Braunschweig wurden eigens für die Charakterisierung des Expressionsprofils regulatorischer T-Zellen hergestellte „mRNA-Chips“ verwendet. Mit diesen „Chips“ wurde das Expressionsprofil von regulatorischen T-Zellen (CD4⁺CD25⁺ T-Zellen) von gesunden Kontroll-Probanden und Morbus Crohn-Patienten verglichen.

Einleitung

Es wurde angenommen, dass die Transkription eines Gens von biologischer Relevanz für CED sei, wenn das Gen eine starke Expression zeigt, die sich zwischen den beiden Gruppen deutlich unterscheidet. In bisher nur als Abstract publizierten Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Genexpression von CCR4 bei Morbus Crohn-Patienten signifikant vermindert ist im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen, nämlich um das Fünf- bis Sechsfache, je nach inaktivem (iCD) oder aktivem (aCD) Erkrankungsstadium (iCD vs HC: 6.4fach; aCD vs HC: 5.0fach)

Wie oben beschrieben, ist CCR4 ein wichtiger Rezeptor für die Migration regulatorischer T-Zellen. Bei verminderter CCR4-Expression könnte die Migration von regulatorischen T-Zellen gestört sein und sich als Konsequenz hiervon im entzündeten Darm weniger regulatorische T-Zellen finden.

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Regulatorische T-Zellen von Patienten mit Morbus Crohn zeigen in der Genexpressionsanalyse deutliche Unterschiede zu regulatorischen T-Zellen von Gesunden. Hierbei fällt vor allem eine Herabregulation der RNA für den Chemokinrezeptor CCR4 auf, der die Migration zu entzündetem Gewebe vermittelt. Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen findet sich eine verminderte Anzahl regulatorischer T-Zellen in der Darmmukosa im Verhältnis zu Entzündungsprozessen bei Gesunden. Hieraus ergibt sich die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese, dass die chronische Entzündung bei Morbus Crohn eine Folge einer verringerten Migration durch reduzierte CCR4-Rezeptorexpression ist.

Aus den bisher vorliegenden Daten ergeben sich folgende Fragestellungen:

In welchen zellulären Kompartimenten (peripheres Blut, mesenteriale Lymphknoten) lassen sich CCR4⁺ regulatorische T-Zellen nachweisen. Finden sich Unterschiede zwischen Patienten mit Morbus Crohn und gesunden Kontrollpersonen?

Welche phänotypischen Eigenschaften finden sich, die Rückschlüsse auf die Funktion dieser Zellen in den entsprechenden Kompartimenten zulassen? Finden sich Unterschiede zwischen Patienten mit Morbus Crohn und gesunden Kontrollpersonen?

Finden sich außerdem funktionelle Konsequenzen (verminderte Migration) durch die verminderte CCR4-Genexpression bei regulatorischen T-Zellen von Patienten mit Morbus Crohn?

Zielsetzung der Arbeit ist, die oben genannte Hypothese der verminderten Anzahl regulatorischer T-Zellen bei Morbus Crohn als Konsequenz der verminderten CCR4-Expression zu stützen. Durch detaillierte Analysen in zwei zellulären Kompartimenten (peripheres Blut und mesenteriale Lymphknoten) und durch funktionelle Untersuchungen soll versucht werden, die Dysbalance von regulatorischen T-Zellen und Effektorzellen über Migrationsprozesse bei der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn zu erklären.

3 Material und Methoden

3.1 Probanden

Im Folgenden werden die Begriffe Patient und Proband für männliche und weibliche Personen benutzt.

Peripheres Blut wurde von 21 Personen (13 weiblich und 8 männlich) mit Morbus Crohn gewonnen. Davon zeigten 13 ein aktives und 8 Patienten ein inaktives Erkrankungsstadium. Als aktiv wurde die Erkrankung bei einem Harvey-Bradshaw-Index (HBI) ≥ 4 (Harvey und Bradshaw 1980) oder, falls vorhanden, bei einem Crohn's Disease Activity Index (CDAI) > 150 (Best u.a. 1979) angesehen. Bei kleineren Werten entsprechend als inaktiv. Das mittlere Alter lag bei 40 Jahren (20 - 68 Jahre). Eine genaue Charakterisierung der Patienten mit Morbus Crohn wurde nach folgender Tabelle (s. Tab. 4) vorgenommen.

Tabelle 4:

Klassifikation der Morbus Crohn-Patienten.

Alter , durchschnittlich (range)	40	(20-75)
Geschlecht , n (% der Patienten)		
männlich	8	(38)
weiblich	13	(62)
Mittlere Krankheitsdauer in Jahren (range)	10	(1-39)
Ort der Erkrankung , n (% der Patienten)		
Ileokolon	11	(52)
Kolon	7	(33)
Terminales Ileum	3	(14)
Erkrankung , n (% der Patienten)		
nicht stenosierend, nicht fistelnd	9	(43)
stenosierend	9	(43)
fistelnd	3	(14)
Alter bei Diagnosestellung , n (% der Patienten)		
16 Jahre und jünger	1	(5)
17-40 Jahre	15	(71)
>40 Jahre	5	(24)
Resektionen , n (% der Patienten)	10	(48)
Medikation , n (% der Patienten)		
keine Medikation	3	(14)

Mesalazin	1	(5)
Kortikosteroide	9	(43)
Azathioprin oder 6-Mercaptopurin	8	(38)
Methotrexat	1	(5)
Infliximab	3	(14)

Mesenteriale Lymphknoten wurden von 13 Morbus Crohn-Patienten gewonnen, die sich einer Darmresektion unterzogen (ileozökale Resektion bei Stenose n=4; ileozökale Resektion bei Abszess/Konglomerattumor n=3; Proktokolektomie n=2; Resektion nicht entzündlicher Stenosen n=2; fistulierende Proktitis n=1; Adhäsionen n=1).

15 gesunde Personen erklärten sich bereit, als Kontrollgruppe bei Analysen zu peripheren Blutlymphozyten zu dienen (11 weiblich, 4 männlich), mittleres Alter 34 Jahre (23 - 49 Jahre). 3 Probanden erklärten sich bei kleinen Eingriffen zur Entnahme mesenterialer Lymphknoten bereit (1 weiblich, 2 männlich), mittleres Alter 58,7 Jahre (38-77 Jahre).

10 Patienten mit einer akuten Divertikulitis (5 weiblich, 5 männlich), mittleres Alter 54,6 Jahre (41 - 75 Jahre) wurden untersucht.

Ein positives Ethikvotum (Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin-Campus Benjamin Franklin) liegt für die Studie vor. Die Probanden wurden informiert und ihr schriftliches Einverständnis wurde vor Einschluss in die Studie eingeholt.

3.2. Laborartikel

3.2.1 Puffer, Lösungen, Medien

Zellkulturmedium für humane Zellen	RPMI-1640 Stable glutamine low endotoxin w 2.0g/l NaHCO ₃ 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
FACS-Puffer	PBS 0,5% BSA 0,1% Natriumazid (NaN ₃)
MACS-Puffer	PBS 0,5% BSA

Beriglobin	2mM EDTA ZLB Behring, Hattersheim, Deutschland
Bovines Serum Albumine BSA Fraction V, low endotoxine	PAA, Cölbe, Deutschland
CountBright Absolute Counting Beads	Molecular Probes, Eugene, USA
EDTA, ultra pure	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Fetal Calf Serum, FCS	Perbio Science, Erembodegem, Belgien
HBSS	PAA, Cölbe, Deutschland
HEPES Buffer Solution (1M)	PAA, Cölbe, Deutschland
Medium RPMI-1640	Biochrom, Berlin, Deutschland
PBS Dulbecco´s PBS	PAA, Cölbe, Deutschland
Penicillin, Streptomycin	PAA, Cölbe, Deutschland
Permeabilisierungspuffer	BD, Heidelberg, Deutschland
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), Ratten-Serum	PAA, Cölbe, Deutschland Dako, Glostrup, Dänemark

3.2.2 Sonstige Reagenzien und Chemikalien

Collagenase D	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Ficoll, Biocoll Separating Solution	Biochrom, Berlin, Deutschland
Maus-Kollagen Typ IV	BD, Heidelberg, Deutschland
Nycodenz	Axis-Shield, Oslo, Norwegen
TARC/CCL17	Pepro Tech, Hamburg, Deutschland
T-Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Trypanblau Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

3.2.3 Verbrauchsmaterialien

Kanülen, Spritzen	Braun, Melsungen, Deutschland
Kulturplatte 24-Well	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kryo-Tubes	Nunc, Langenselbold, Deutschland
MACS-Separationssäulen (LS)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Nylon Zell-Sieb (70µm)	BD, Heidelberg, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Rundbodenröhrchen 5 ml (FACS)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transwell 3µm Porengröße, 6,5mm Einsatz	Costar Corning, Acton, USA
Vacutainer	BD, Heidelberg, Deutschland

Reaktionsgefäße, Pipettenaufsätze und sonstige Verbrauchsmaterialien stammen von den Firmen Eppendorf, Corning, Sarstedt und Becton Dickinson (BD).

3.2.4 Geräte

Durchflusszytometer FACSCalibur	BD, Heidelberg, Deutschland
Inkubator B6, BB16 CU	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Deutschland
Kühltruhe, Nap Coil UF 500	Labotect, Göttingen, Deutschland
Mikroskop	Zeiss, Berlin, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetboy	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Serologische Pipetten Falcon	BD, Heidelberg, Deutschland
Sterilbank, Nuaire Class II	Heraeus, Hanau, Deutschland

Stickstofftank, Arpege 140 und Locator 6 Plus	Messer, Sulzbach, Deutschland
Vortexer	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad	Julabo, Seelbach, Deutschland
Waage für Chemikalien	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge, Megafuge 1.0R, Multifuge 3SR	Heraeus, Hanau, Deutschland
Gefrierschrank -20° C	Liebherr, Deutschland

3.2.5 Antikörper

Tabelle 5:
Humane Antikörper.

Name der antigenen Struktur	Fluorochrom	Klon	Firma
Alexa Fluor 488 FOXP3	FITC	PCH 101	eBiosciences
Beta 7	PE	FIB 504	Becton, Dickinson
Beta 7	APC	FIB504	Becton, Dickinson
CCR 4	PE	1G1	Becton, Dickinson
CD 25	FITC	M-A251	Becton, Dickinson
CD 3	PE	MEM-57 mouse	Immunotools
CD 4	PerCP	SK3	Becton, Dickinson
CD 4	APC	RPA-T4	Becton, Dickinson
CD 45 RA	APC	HI 100	Becton, Dickinson
CD 45 RO	PE	UCHL1	Becton, Dickinson

CD 62L	FITC	Dreg 56	Becton, Dickinson
FOXP3	APC	PCH 101	eBiosciences
Isotypkontrollen			Becton, Dickinson

Becton und Dickinson (BD): Heidelberg, Deutschland

eBiosciences: Hatfield, United Kingdom

Immunotools: Friesoythe, Deutschland

Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung der Leukozyten aus peripherem Blut

Jeweils 10 bis 20 ml heparinisiertes Vollblut von einem Probanden wurde in ein 50 ml-Tube überführt. Das Tube wurde anschließend mit Medium auf 30 ml aufgefüllt. Dann wurden in einem neuen Tube 15 ml FICOLL mit dem Blut-Medium-Gemisch überschichtet und bei 2500 U/min für 20 Minuten bei 25 °C ohne Bremse zentrifugiert. Der durch die Dichtezentrifugation gewonnene Zellring mit peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) wurde in ein neues 50 ml-Tube überführt und einmal mit RPMI-Medium gewaschen (Zentrifugation bei 2000 U/min für 10 Minuten bei 4°C).

3.3.2 Isolierung der Leukozyten aus mesenterialen Lymphknoten

Mesenteriale Lymphknoten (MLN) wurden von frischen Darmresektaten gewonnen. Die MLNs wurden mit Collagenase D inkubiert. Das mechanisch zerkleinerte Gewebe wurde dann in RPMI-Medium mit 2% FCS und HEPES bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Während der letzten 5 Minuten wurde 1 ml EDTA zugegeben. Anschließend wurde das Gewebe durch ein Nylon Zell-Sieb gefiltert und in ein 50ml-Tube überführt. Nun wurden die Zellen gewaschen (1500U/min für 10 Minuten bei 4°C) und in HBSS, 1

mM EDTA und 1% FCS resuspendiert. Nach der Zellzählung und einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen in 4 ml 14,5% Nycodenz in HBSS und 1 mM EDTA aufgenommen. In einem 15 ml-Tube wurden die Zellen mit 2 ml HBSS, 1 mM EDTA und 1% FCS überschichtet und bei 2300 U/min für 12 Minuten bei 4°C ohne Bremse anhand ihres Dichte-Gradienten isoliert.

Nach einer anschließenden Waschung wurden die Zellen gezählt.

3.3.3 Zellzählung

Nach dem Waschschrift wurde das Pellet in 10 ml Waschmedium aufgenommen. Davon wurden 10 µl abgenommen, 1:10 mit Trypanblau (0,4%) gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen in 16 Feldern eines Quadrats ausgezählt (n). Tote Zellen konnten ausgeschlossen werden. Die Gesamtzahl der vitalen Zellen ergibt sich aus der Formel: Gesamtzellzahl = $n \times 10$ (Verdünnungsfaktor) $\times 10$ (Volumen) $\times 10^4$.

3.3.4 Zellsortierung

MACS-Separation (Magnetic Activated Cell Sorting):

Bei dieser Sortierung von Zellen werden bestimmte Oberflächenmoleküle von Zellen durch monoklonale Antikörper markiert. Diese Antikörper sind an magnetische Mikropartikel, so genannte „Beads“ (engl.: bead, Kügelchen; 20-100 nm Durchmesser) gebunden. Die so präparierten Zellen werden anschließend auf eine ferromagnetische Säule gegeben, die sich in einem starken Magnetfeld befindet. Die selektiv markierten Zellen werden in der Säule zurückgehalten. Nicht markierte Zellen passieren die Säule. Nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld können die nun nicht mehr haftenden Zellen leicht ausgespült werden.

Es besteht das Prinzip der Anreicherung (positive Selektion) oder der Depletion (negative Selektion) bestimmter Zellpopulationen, wobei unterschiedliche Säulen verwendet werden müssen.

CD4⁺ Zellen wurden durch die MACS-Sortierung gewonnen. Hierbei wurde das Prinzip der „untouched isolation“ (positive Selektion) angewendet. Die CD4⁻ Zellen (B-Zellen,

Monozyten, Natürliche Killerzellen, Zytotoxische T-Zellen, Dendritische Zellen, Erythrozyten-Vorläuferzellen, Thrombozyten und Basophile Granulozyten) wurden durch einen Antikörper-Cocktail (CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36, und CD56) markiert und durch gekoppelte Beads magnetisch in der Säule zurückgehalten.

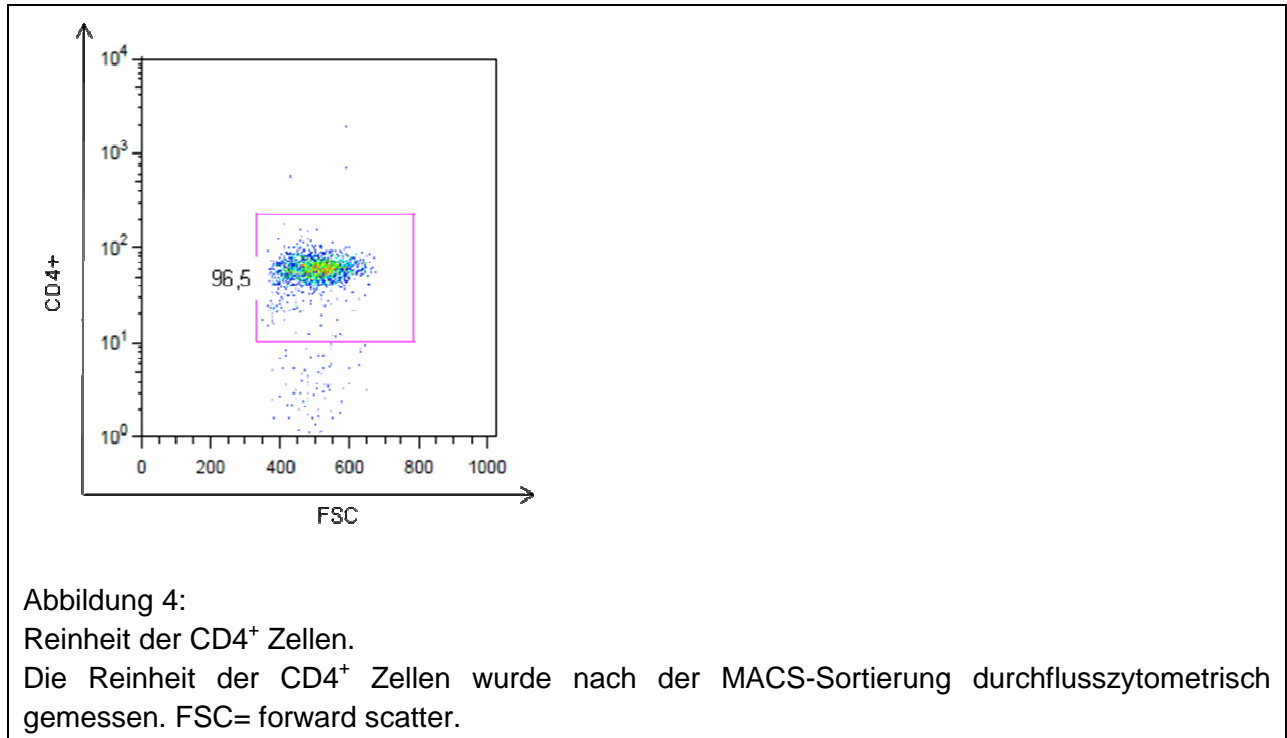
Spezielles Vorgehen:

Das Zellpellet der PBMCs wurde in 40 μl MACS-Puffer pro 10^7 Zellen und 1 μl Beriglobin pro 50 μl Endvolumen resuspendiert. Außerdem wurde 10 μl Biotin-Antibody Cocktail pro 10^7 Zellen zugegeben und für 10 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden weitere 30 μl MACS-Puffer pro 10^7 Zellen zugegeben und 15 Minuten kühl und dunkel inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen (1500 U/min für 10 Minuten bei 4°C) und dann in 500 μl MACS-Puffer pro 10^7 Zellen gelöst.

Die Zellsuspension wurde anschließend auf eine mit MACS-Puffer vorher gespülte LS-Säule gegeben. Die markierten Zellen wurden im magnetischen Feld einer Isolationssäule zurückgehalten, während die CD4^+ Zellen in einem 50 ml-Tube aufgefangen und für die folgenden Experimente verwendet werden konnten.

3.3.5 Reinheit der CD4^+ -Sortierung

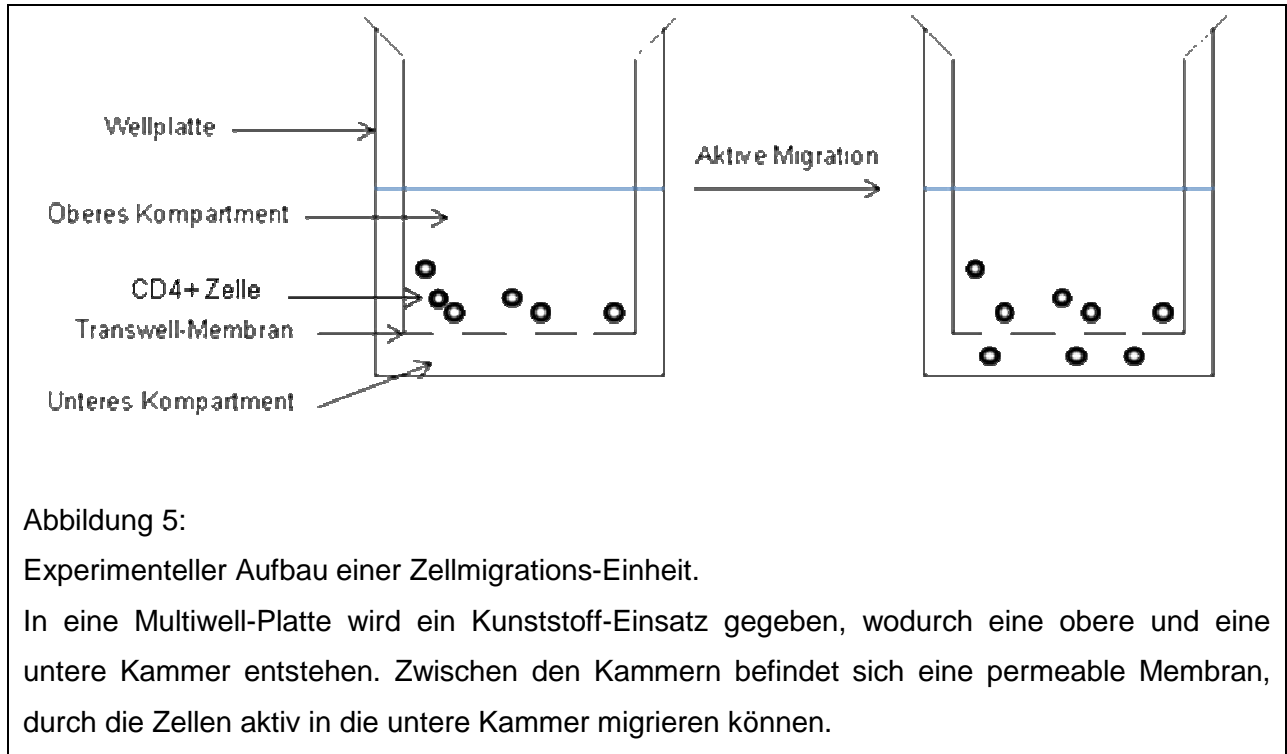
Um eine unspezifische Zellsortierung auszuschließen, wurde die Reinheit der CD4^+ Zellen durchflusszytometrisch kontrolliert. Die Reinheit der CD4^+ Zellen lag nach der MACS-Sortierung zwischen 87% und 97% (s. Abb. 4).



3.4 Migrationsassay

Für einen Migrationsassay wurde eine 24-Well-Platte verwendet, in die Transwells eingesetzt wurden. In die obere Kammer wurden die Zellen in Medium gelöst gegeben. In der unteren Kammer befand sich Medium mit einer bestimmten Konzentration des Chemokins TARC. Durch eine permeable Membran konnten T-Zellen in die untere Kammer wandern. Die Versuche wurden mit je einem Morbus Crohn-Patienten und einem gesunden Probanden zeitgleich und auf derselben Well-Platte („gematcht“) durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte nach 4 Stunden Migrationszeit. Hierbei zeigte sich in Hinblick auf die Zellzahl und in Relation zum Noise/Background die genaueste Messung. Die Chemokin-Konzentration für TARC lag bei unseren Versuchen bei 10 ng/ml und wurde für alle Versuche verwendet (s. Abb. 5).



3.4.1 Beschichtung der Transwells mit Kollagen

Eine Kollagenbeschichtung diente zur Verringerung unspezifischer Zellmigration. Die Transwells wurden am Vortag des Versuches mit je 340 μl Kollagenlösung langsam beschichtet. Die Kollagenlösung (20 $\mu\text{g/ml}$) setzte sich aus Maus-Kollagen und Salzsäure (HCl 0,05 M) zusammen. Die Wellplatte wurde mit der Lösung über Nacht im Kühlschrank (bei 4°C) inkubiert.

3.4.2 Migrationsmedium

Das Migrationsmedium setzte sich aus RPMI-Medium, 10 mM HEPES und 0,5% BSA zusammen. Die Zellen wurden mit Migrationsmedium auf 1×10^6 Zellen /100 μl Medium eingestellt. In eine 24-Well-Platte wurde 500 μl Migrationsmedium ohne oder mit 10 ng/ml TARC gegeben. Anschließend wurde der Transwell-Einsatz auf die gefüllten Wells gesetzt. Eine Äquilibration der Zellsuspension und des Mediums erfolgte dann im Inkubator bei 37 °C und einer CO_2 Konzentration von 6,1% wasserstoffgesättigt für 10 Minuten.

Nun wurde die Zellsuspension in den Einsatz gegeben.

Nach der Migrationszeit von 4 Stunden im Inkubator bei 37°C und einer CO₂ Konzentration von 6,1% wasserdampfgesättigt wurden die Zellen aus den unteren Kammern getrennt geerntet. Zur vollständigen Zellaufnahme wurden die Wells zweimal mit FACS-Puffer gespült.

3.5 Durchflusszytometrie

3.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Fluoreszenz besteht in dem durch Strahlung angeregten Leuchten eines Stoffes. Fluoreszierende Verbindungen absorbieren Lichtenergie über einen charakteristischen Wellenlängenbereich, das Absorptionsspektrum. Durch die Lichtenergie werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben und beim Rückgang zum Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon, was als Fluoreszenz bezeichnet wird (Maecker u. a. 2004).

In einem FACS-Gerät (FACS; Fluorescence activated cell sorting) werden Zellen in Lösung durch eine Kapillare in das Gerät eingesaugt und passieren dabei einen Laserstrahl. Ein Detektor (Photomultiplier) analysiert das gestreute Licht, was mit der Größe und Komplexität der Zelle korreliert. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) ist ein Maß für die Beugung des Lichts und ist vom Volumen der Zelle abhängig. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sidewards Scatter*) ist ein Maß für die Brechung des Lichts, abhängig von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Vesikel im Inneren. Pro Sekunde können bis zu 20000 Zellen typisiert werden.

Neben der Größe und der Expression von Oberflächenstrukturen ist auch die intrazelluläre Beschaffenheit ein Charakteristikum zur Differenzierung von Zellen. Mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die gegen Oberflächenstrukturen gerichtet sind, können verschiedene Proteine durchflusszytometrisch sichtbar gemacht werden.

Eine genauere Charakterisierung von Zellen wird möglich, wenn mehrere Filter (Gates), bestimmte Parameterkombinationen, gleichzeitig zur Anwendung kommen und so z.B. Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften miteinander korreliert werden.

Fluorochrome:

In der Fluoreszenzzytometrie werden vorwiegend Argon-Ionen-Laser verwendet, welche Licht mit einer Wellenlänge von 488nm generieren. Die Fluorochrome haben ihr Absorptionsmaximum (Wellenlängenspektrum des einfallenden Lichtes, das absorbiert werden kann) deshalb in diesem Wellenlängenbereich. Werden mehrere Fluoreszenzfarbstoffe parallel verwendet (Mehrfarbenfluoreszenzanalyse), sollten Farbstoffe gewählt werden, die sich hinsichtlich ihres Emissionsspektrums (Wellenlängenspektrum der emittierten Lichtstrahlen) deutlich voneinander unterscheiden.

Mit einer Vierfachfärbung monoklonaler Antikörper wurden PBMCs und MLNs fluorezenzzytometrisch analysiert.

FITC (Fluorescein) oder Alexa 488	Absorption: 488nm, Emission: 530nm
PE (Phycoerythrin)	Absorption: 488nm, Emission: 585nm
PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein)	Absorption: 488nm, Emission: 670nm
APC (Allophycocyanin)	Absorption: 635nm, Emission: 661nm

Neuere FACS-Geräte können bis zu 18 Fluoreszenzen messen (BD LSR und ADRIA-Geräte). Leider standen zum Zeitpunkt der Messungen diese Möglichkeiten nicht zur Verfügung.

Isotypenkontrolle:

Bei der Auswertung der Proben wurde eine Isotypenkontrolle mitgeführt, anhand derer die Spezifität der Färbung überprüft werden konnte.

3.5.2 FACS-Zählung mittels Beads

Zur absoluten Zellzahlbestimmung eignen sich Zähl-Beads. Bei einer stabilen Durchflussrate (Volumen pro Zeiteinheit) des Durchflusszytometers lässt sich die Zellzahl pro Volumen wie folgt berechnen:

Zellkonzentration:

$$(A/B) \times (C/D) = \text{Zellen/ } \mu\text{l}$$

A = Anzahl der Zellereignisse

B = Anzahl der Bead-Ereignisse

C = Anzahl der Beads in der Probe (Beads/x μl)

D = Volumen der Probe (μl)

Die absolute Zellzahl wurde anhand folgender Formel berechnet:

Ausgangspopulation absolut:

$$(Z_{\text{cell}} / Z_{\text{beads}}) * (C_{\text{beads}} / V_{\text{FACS}} * F_{\text{FACS}} * V_{\text{Exp}})$$

Migrierte Population absolut:

$$(Z_{\text{cell}} / Z_{\text{beads}}) * (C_{\text{beads}} / V_{\text{FACS}} * F_{\text{FACS}} * V_{\text{Exp}})$$

C_{beads} : Konzentration der Beads

F_{FACS} : Verdünnungsfaktor FACS

V_{Exp} : Endvolumen im Experiment

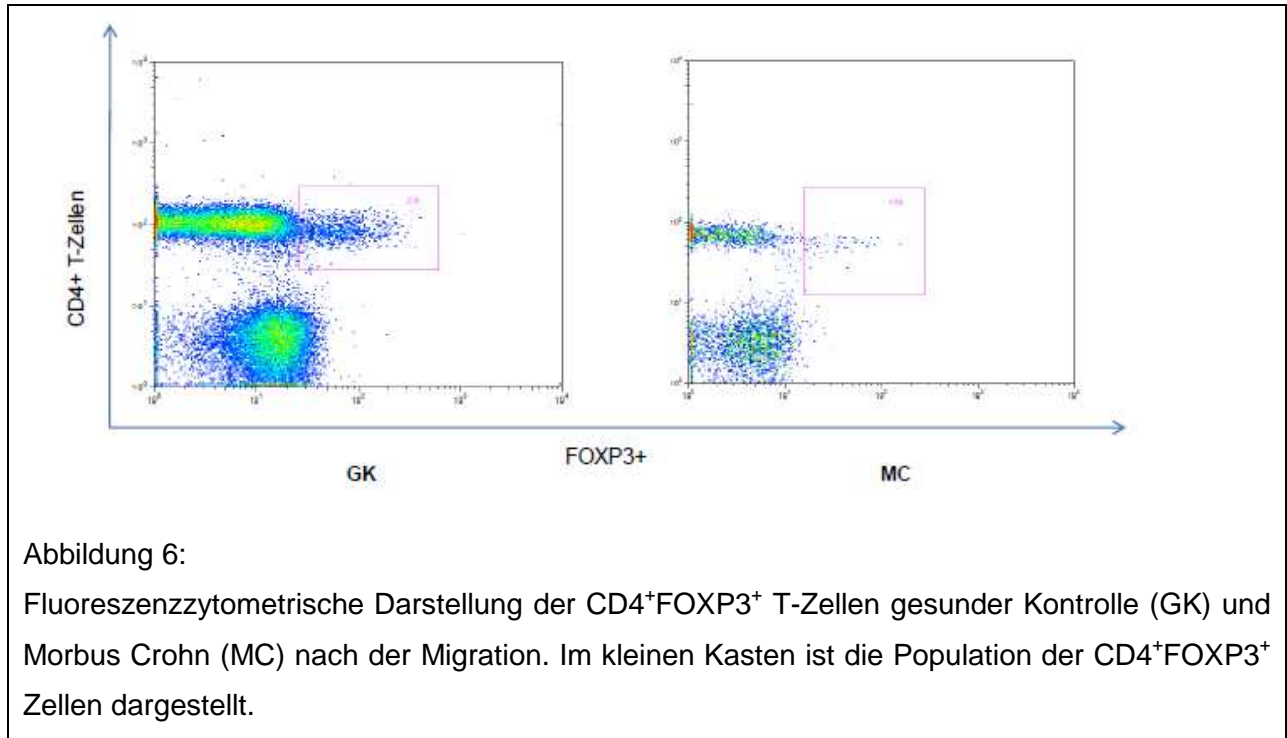
V_{FACS} : FACS-Volumen der Probe (μl)

Z_{beads} : Beadzahl im FACS

Z_{cell} : Zellzahl im FACS

Der Anteil regulatorischer T-Zellen (CD4+FOXP3+) wurde vor und nach der Migration durchflusszytometrisch ausgewertet (s. Abb. 6). So konnten einzelne Populationen angeschaut und ihr prozentualer Anteil angegeben werden.

Aufgrund der beschränkten Möglichkeiten des zur Verfügung stehenden FACS-Gerätes (FACS Calibur) mit 4-facher Färbung wurde die Population der regulatorischen T-Zellen durch die Färbung mit CD4⁺FOXP3⁺ definiert.



3.5.3 Oberflächenfärbung

Die Antikörper wurden in einer nach Herstellerangaben optimalen Konzentration verwendet. Das Gesamtvolumen von 50 µl setzte sich aus dem Antikörper, Beriglobin und FACS-Puffer zusammen. Beriglobin verhindert eine unspezifische Antikörperbindung, die zu einer unspezifischen Färbung der Zellen führen würde.

Danach wurden die Zellen in Dunkelheit und auf Eis inkubiert. Die Färbung wurde nach 10 Minuten (bzw. nach Herstellerangaben) durch Zugabe von 1 ml PBS gestoppt. Danach wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet erneut aufgeschüttelt und der Waschvorgang wiederholt.

Anschließend wurden die Zellen mit FOXP3 gefärbt oder fixiert (s.u.).

Bei jeder Färbung wurde eine ungefärbte Kontrolle mitgeführt. Außerdem wurde ein Kompensationsansatz für jeden Fluorochromkanal (FITC, PE, PerCP und APC) angefertigt, anhand derer die Einstellungen des FACS-Gerätes vorgenommen werden konnten.

Fixierung der Zellen:

Konnten die Zellen nach der Oberflächenfärbung nicht direkt intrazellulär gefärbt oder durchflusszytometrisch analysiert werden, wurden sie fixiert.

Die Zellen wurden nach der Oberflächenfärbung einmal mit 1 ml PBS gewaschen (1500 U/min für 7 Minuten bei 4°C). Anschließend wurde der Überstand abgegossen. Danach wurden 500 µl der Fixierlösung zugegeben (1 Teil Concentrate zu 3 Teilen Diluent) und die Zellen auf Eis für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach nochmaliger Waschung mit 1 ml PBS wurden sie mit 400 µl FACS-Puffer im Kühlschrank aufbewahrt.

3.5.4 Intrazelluläre FOXP3-Färbung

Für die FOXP3-Färbung wurden die Zellen mit Permeabilisierungspuffer (1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt) zweimal gewaschen (1500 U/min für 4 Minuten bei 4°C). Dann folgte eine 15minütige Inkubation mit 50 µl Ratten-Serum-Arbeitslösung (50 µl Permeabilization-Buffer + Beriglobin mit 10 µl Ratten-Serum) zur Vermeidung unspezifischer Bindungen. Nun wurde 10 µl FOXP3-Antikörper hinzugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen zweimalig mit Permeabilisierungspuffer (1:10 mit destilliertem Wasser) gewaschen, in FACS-Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3.6 Statistische Auswertung

Angewandt wurde der Mann-Whitney U-Test für ungepaarte Daten. Für gepaarte Migrationsversuche wurde der Test für gepaarte Stichproben verwendet. Als statistisch signifikant wurde ein Wert von $p < 0,05$ angesehen.

Die Daten des FACS-Calibur-Gerätes wurden mit der CellQuest Software ausgewertet. Außerdem wurde das Programm FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software, Oregon, USA) sowie die Software GraphPad (GraphPad Prism 5.01, Graphpad Software, La Jolla, USA) benutzt.

4 Ergebnisse

4.1 Oberflächencharakterisierung der T-Zellen des peripheren Blutes und mesenterialer Lymphknoten bei Morbus Crohn und gesunden Kontrollen

Der relative Anteil aller folgenden Ergebnisse bezieht sich, wenn nicht anders beschrieben, auf die CD4⁺ Lymphozytenpopulation.

4.1.1 CD4- und FOXP3- Expression

Die regulatorischen T-Zellen wurden durch die CD4+FOXP3+ Färbung (Saruta u. a. 2007) definiert. Dies erschien bei den dargestellten Untersuchungen aufgrund der technisch eingeschränkten Möglichkeiten und für die durchgeführten Versuche als ausreichend.

Bei folgend dargestellten Analysen war der prozentuale Anteil der CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen im mesenterialen Lymphknoten im Vergleich zum Anteil im peripheren Blut signifikant erhöht (s. Abb. 7). Dieser Unterschied konnte sowohl bei den gesunden Kontrollpersonen (GK) als auch bei den Morbus Crohn-Patienten (MC) belegt werden (GK: MLN 8,82% (4,49-11,6%) und PBMC 2,44% (0,39-6,52%); MC: MLN 8,78% (4,37-19,4%) und PBMC 1,88% (0,12-4,21%)).

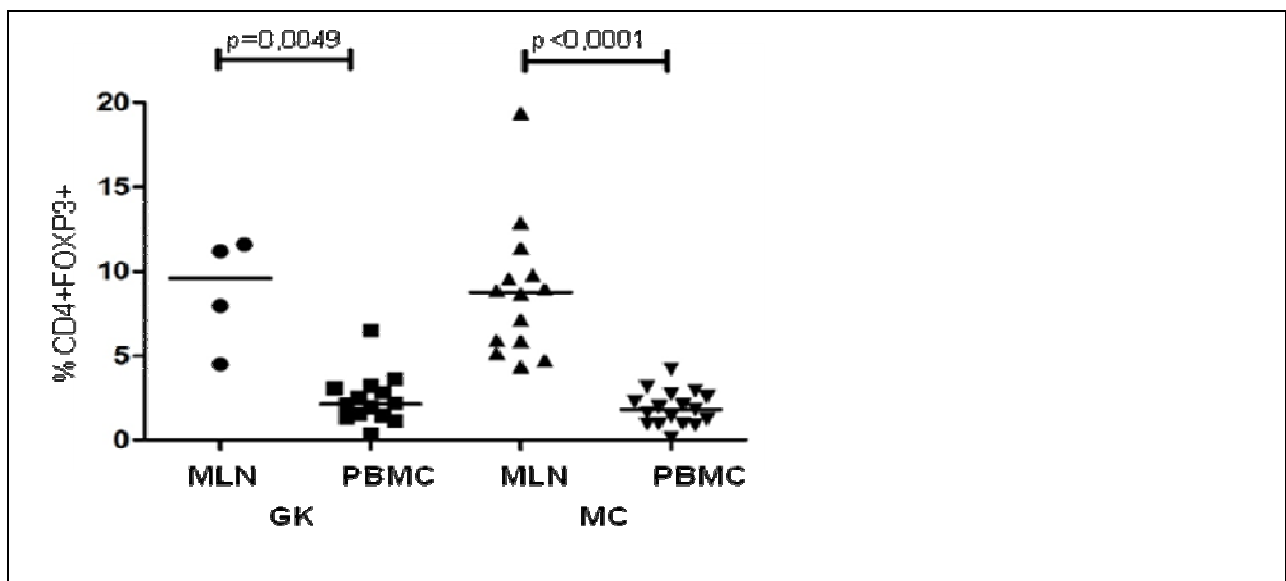


Abbildung 7:

Vergleich des prozentualen Anteils der CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen von gesunden Kontrollen (GK) und Morbus Crohn-Patienten (MC) im mesenterialen Lymphknoten (MLN) (GK, n=4; MC, n=14) und im peripheren Blut (PBMC) (GK, n=14 und MC, n=17).

4.1.2 CD62L-Expression

CD62L ist ein wichtiger Rezeptor für das Zirkulieren und gezielte Einwandern von T-Zellen, d.h. die Migration von Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe (Fu u. a. 2004). Daher wurde in dieser Arbeit CD62L auf der Oberfläche regulatorischer T-Zellen von Morbus Crohn-Patienten und Gesunden untersucht. Dabei zeigte sich, dass der prozentuale Anteil der CD62L⁺ regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut der Morbus Crohn-Gruppe signifikant niedriger als bei gesunden Kontrollen ist (MC 53,1% (29,1 - 93%), GK 79,23% (41,6 - 93,1%)) (s. Abb. 8).

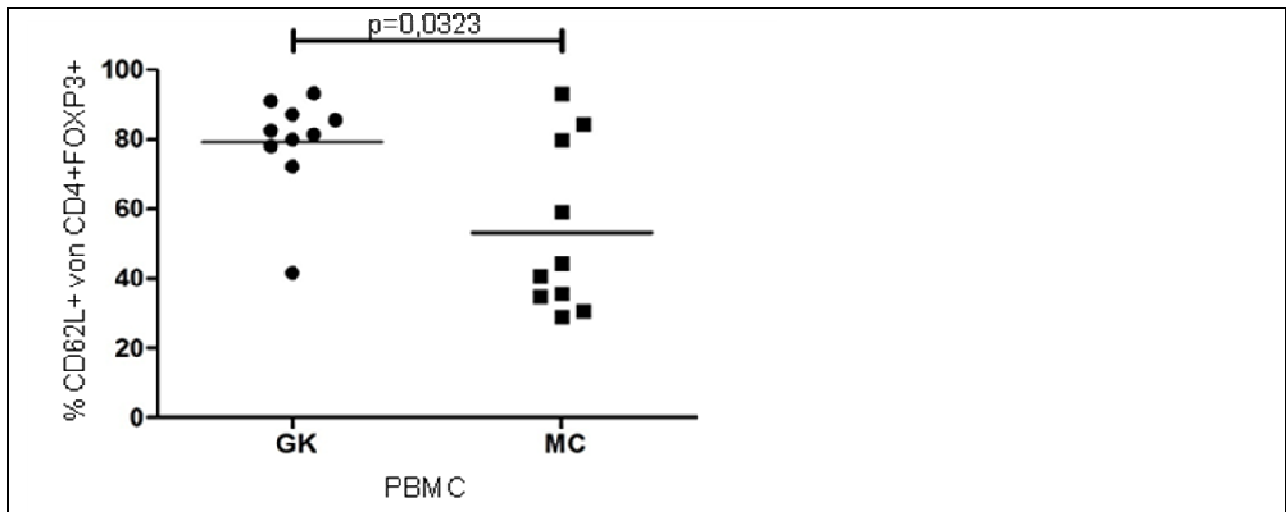


Abbildung 8:

Prozentualer Anteil CD62L⁺ T-Zellen der CD4⁺FOXP3⁺ T-Zell-Fraktion von gesunden Kontrollen (GK, n=10) und Morbus Crohn-Patienten (MC, n=10) im peripheren Blut (PBMC).

4.1.3 CCR4-Expression

Der Chemokinrezeptor CCR4 gilt als wichtiger Rezeptor für spezifische Wanderungsvorgänge von T-Zellen in entzündetes Gewebe (Yuan u. a. 2007). In Bezug auf die Migration regulatorischer T-Zellen ($CD4^+FOXP3^+$) war dieser Rezeptor von speziellem Interesse bei den vorliegenden Analysen.

Die CCR4-Expression auf $CD4^+$ T-Zellen gesunder Kontrollen unterschied sich nicht eindeutig zwischen den mesenterialen Lymphknoten und dem peripheren Blut (MLN 11,62% (7,58-18,1%), PBMC 8,566% (4,24-12,2%)). Dagegen war der Anteil $CD4^+CCR4^+$ T-Zellen im peripheren Blut von Morbus Crohn-Patienten erhöht, während sich im mesenterialen Lymphknoten weniger dieser Zellen fanden (MLN 6,645% (1,96-15,2%), PBMC 11,87% (0,4-26,3%)) (s. Abb. 9).

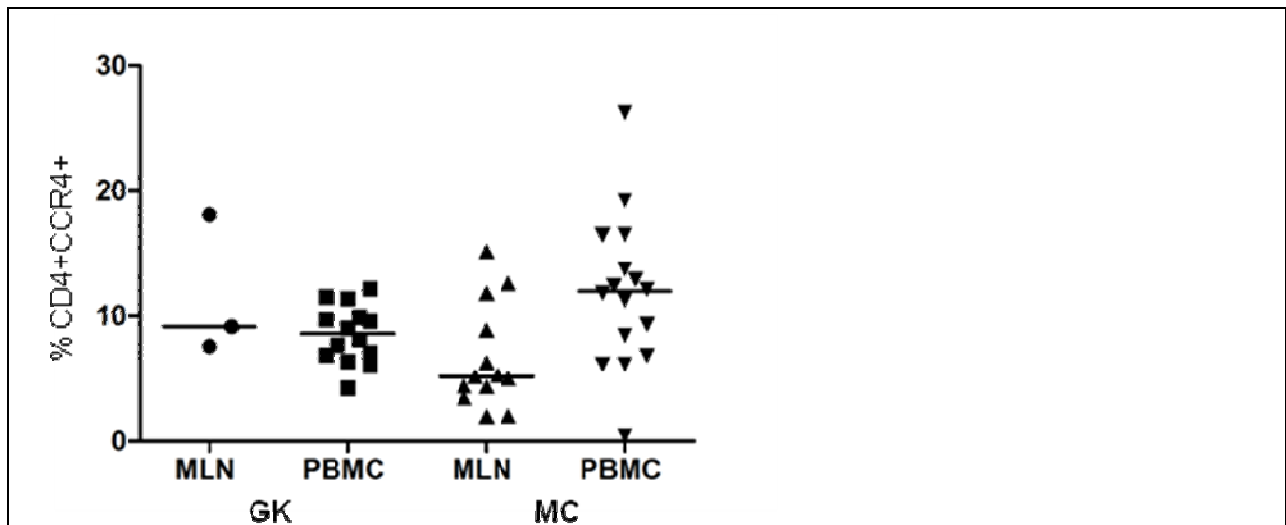


Abbildung 9:

Prozentualer Anteil $CD4^+CCR4^+$ T- Zellen von gesunden Kontrollen (GK) und Morbus Crohn-Patienten (MC) im mesenterialen Lymphknoten (MLN) (GK, n=3 und MC, n=13) und im peripheren Blut (PBMC) (GK, n=14 und MC, n=16).

Folglich stellte sich die Frage, ob der prozentuale Anteil der $CCR4^+$ Zellen speziell der regulatorischen T-Zellen ($CD4^+FOXP3^+$) im peripheren Blut zwischen Gesunden und Morbus Crohn-Patienten unterschiedlich ist. Es wurden auch regulatorische T-Zellen

von Divertikulitis-Patienten (DIV) mit untersucht. Der Unterschied zwischen den gesunden Kontrollen (GK 63,61% (38,5-87,7%)) und Morbus Crohn-Patienten (MC 72,24% (28,7-96,2%)) war nicht signifikant. Dennoch war tendenziell bei Morbus Crohn eine leicht erhöhte Fraktion CCR4⁺ regulatorischer T-Zellen zu beobachten.

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den CCR4⁺ regulatorischen T-Zellen Gesunder und der Divertikulitis-Gruppe sowie zwischen der Morbus Crohn- und der Divertikulitis-Gruppe. In der Divertikulitis-Gruppe war der geringste Anteil CCR4⁺ regulatorischer T-Zellen festzustellen (DIV 53,91% (26,5-75,3%)) (s. Abb. 10A).

In den mesenterialen Lymphknoten war der Anteil CCR4⁺ regulatorischer T-Zellen zwischen Morbus Crohn-Patienten und gesunden Kontrollen nicht signifikant unterschiedlich (GK 43,3% (24,3-87,9%), MC 34,38% (15,7-92,8%)) (s. Abb. 10B).

Im Vergleich zum peripheren Blut, wo der Anteil bei allen Gruppen über 50% CCR4⁺ regulatorischer T-Zellen lag, war im mesenterialen Lymphknoten ein deutlich geringerer Anteil zu beobachten (s. Abb. 10).

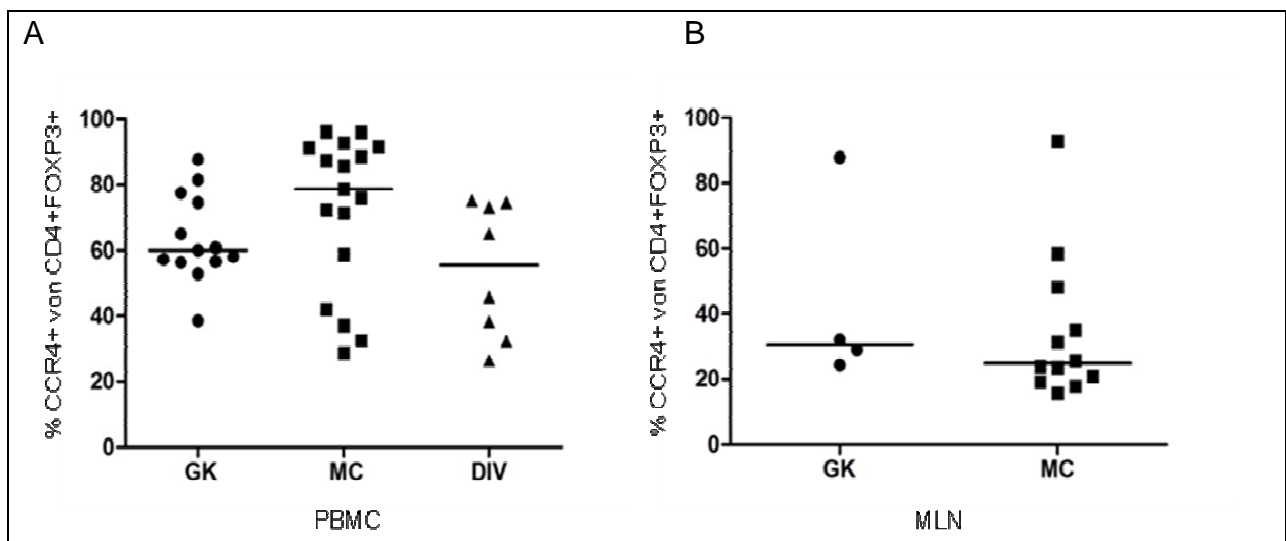


Abbildung 10:

A: CCR4-Expression auf CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen im peripheren Blut (PBMC) von gesunden Kontrollen (GK, n=13), Morbus Crohn- (MC, n=17) und Divertikulitis-Patienten (DIV, n=8).

B: CCR4-Expression auf CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen im mesenterialen Lymphknoten (MLN) von gesunden Kontrollen (GK, n=4) und Morbus Crohn-Patienten (MC, n=12).

Um die Menge gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Zelle der PBMCs zu quantifizieren, wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (normalized Mean Fluorescence-Intensity, nMFI; $nMFI = MFI\ CCR4^+ / MFI\ CCR4^-$) von regulatorischen T-Zellen gemessen.

Die mittlere Fluoreszenzintensität von CCR4 auf den regulatorischen T-Zellen gesunder Kontrollen (GK 26,41 (6,6-60,36)) war im Vergleich zu Morbus Crohn-Patienten erhöht (MC 15,66 (3,07-28,06)). Als entzündliche Kontrolle wurden regulatorische T-Zellen von Patienten mit akuter Divertikulitis (DIV) untersucht. Diese zeigten eine geringere CCR4-Dichte auf den regulatorischen T-Zellen (DIV 11,17 (4-34,29)) als die der Morbus Crohn-Patienten und der gesunden Kontrollen. Die CCR4-Dichte auf regulatorischen T-Zellen Gesunder lag im Vergleich der Gruppen am höchsten. Der Unterschied zwischen den Gesunden und den Morbus Crohn-Patienten sowie zwischen den Gesunden und den Divertikulitis-Proben war signifikant (s. Abb.11A). Die mittlere Fluoreszenzintensität im mesenterialen Lymphknoten unterschied sich zwischen den Gruppen nicht signifikant (GK 17,73 (6,8-33,48) und MC 16,18 (5,460-34,2) (s. Abb. 11B).

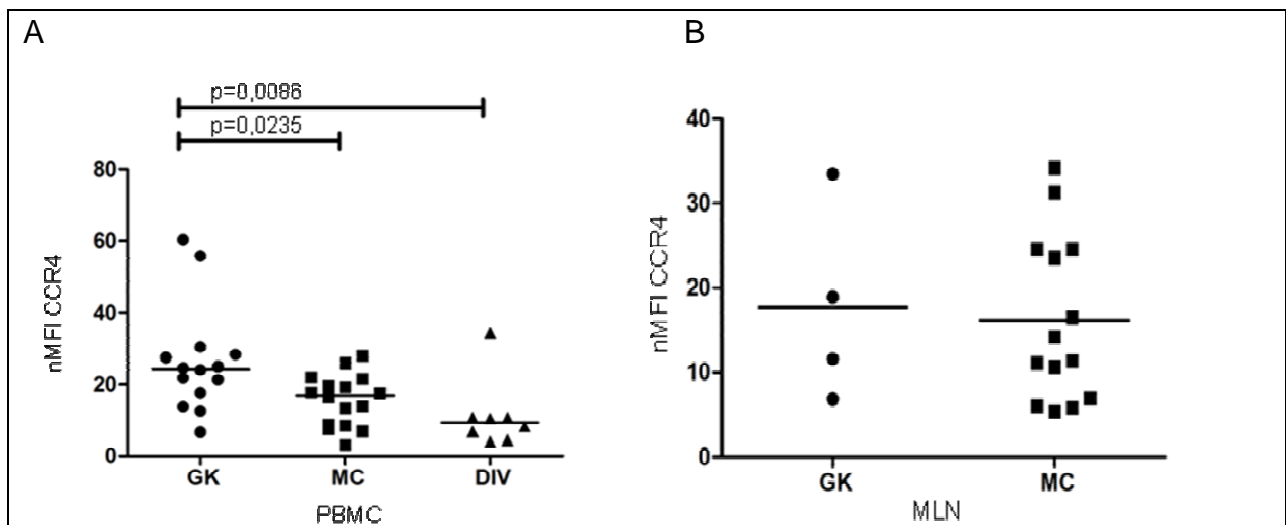


Abbildung 11:

A: Mittlere Fluoreszenzintensität (nMFI) von CCR4 ($nMFI = MFI\ CCR4^+ / MFI\ CCR4^-$) der $CD4^+FOXP3^+$ T-Zellen von gesunden Kontrollen (GK, n=14), Morbus Crohn-Patienten (MC, n=16) und Divertikulitis-Patienten (DIV, n=8) im peripheren Blut (PBMC).

B: Mittlere Fluoreszenzintensität (nMFI) von CCR4 ($nMFI = MFI\ CCR4^+ / MFI\ CCR4^-$) der $CD4^+FOXP3^+$ T-Zellen von gesunden Kontrollen (GK, n=4) und Morbus Crohn-Patienten (MC, n=14) im mesenterialen Lymphknoten (MLN).

4.1.4 Alpha4 Beta7-Expression

Das Integrin Alpha4 Beta7 ist ein heterodimeres Adhäsionsmolekül, das an der gerichteten Migration von Lymphozyten aus dem Gefäßsystem in lymphatische Organe und an den Ort einer Entzündung beteiligt (Wang u. a. 2010).

Aus technischen Gründen musste bei den vorgestellten Untersuchungen die Färbung auf die Beta-Einheit (Beta7) beschränkt werden.

Der Anteil Beta7⁺ regulatorischer T-Zellen war im peripheren Blut signifikant geringer als im mesenterialen Lymphknoten. Dieser Unterschied konnte sowohl für die gesunden Kontrollen (GK: MLN 16,1% (10,2-27,7%), PBMC 7,847% (4,04-12,2%)) als auch die Morbus Crohn-Patienten (MC: MLN 20,97% (4,05-38,9%), PBMC 10,68% (1,78-27,5%)) festgestellt werden (s. Abb. 12).

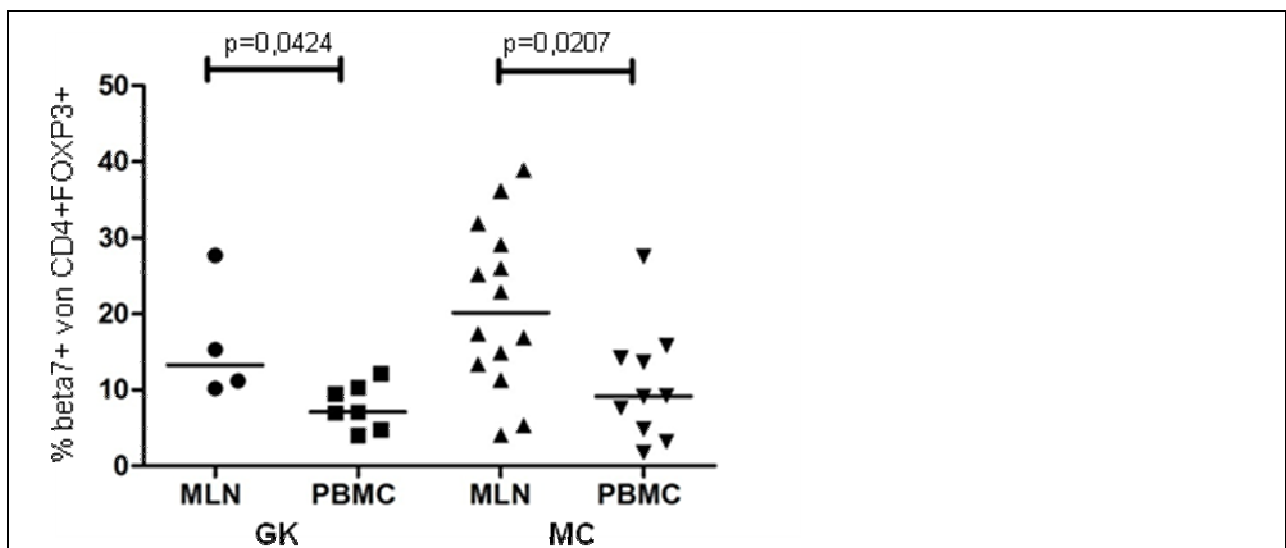
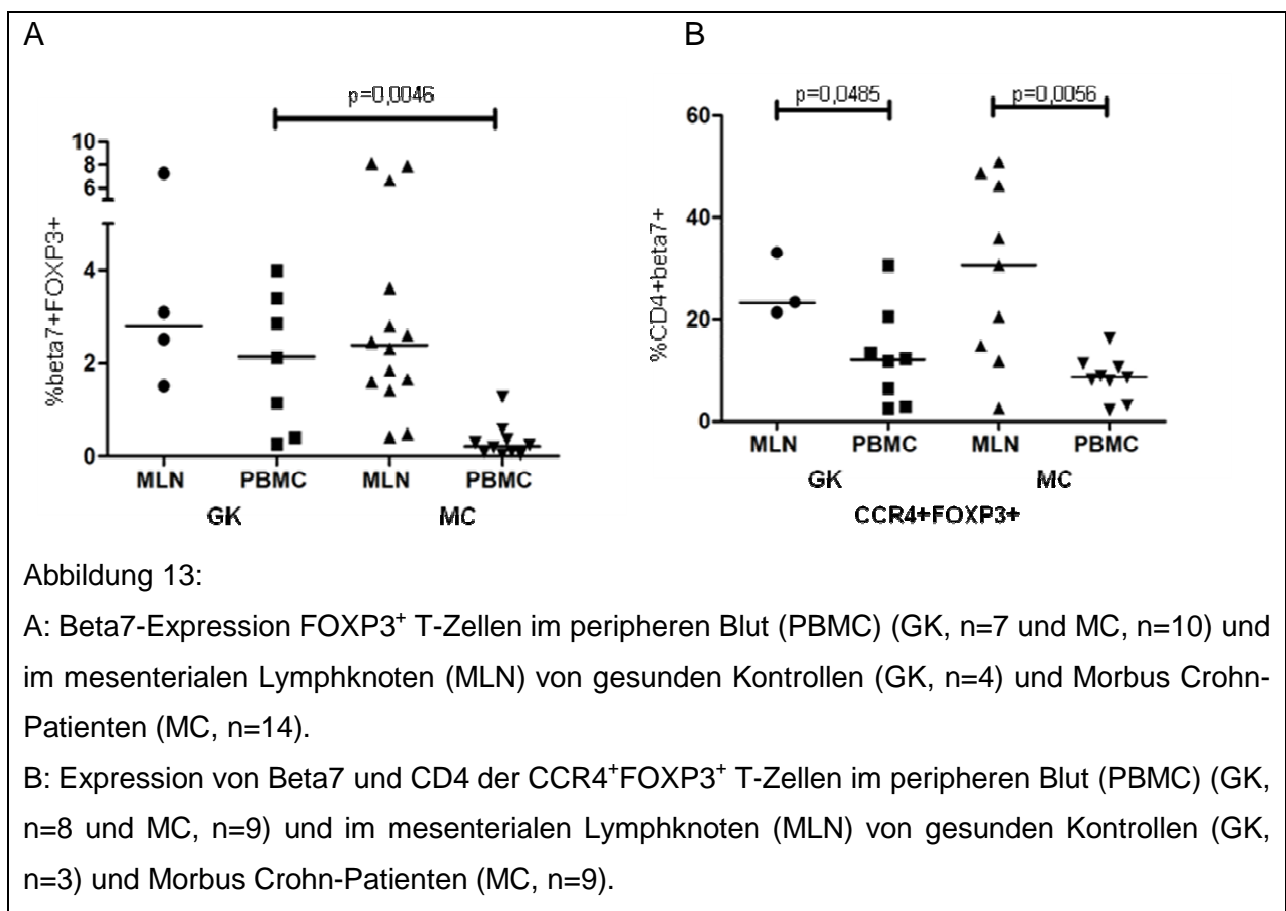


Abbildung 12:

Beta7-Expression von CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen gesunder Kontrollen (GK) und Morbus Crohn-Patienten (MC) im mesenterialen Lymphknoten (MLN) (GK, n=4 und MC, n=14) und im peripheren Blut (PBMC) (GK, n=7 und MC, n=10).

Der Vergleich doppeltpositiver T-Zellen (Beta7⁺ und FOXP3⁺) von Morbus Crohn-Patienten und Gesunden im peripheren Blut (MC 0,321% (0,039-1,28%), GK 2,027% (0,26-3,99%)) und im mesenterialen Lymphknoten (MC 3,139% (0,42-8,15%), GK 3,598% (1,51-7,28%)) ergab eine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils im

peripheren Blut beim Vergleich von Morbus Crohn-Patienten und Gesunden. Im mesenterialen Lymphknoten unterschied sich der Anteil nicht signifikant (s. Abb. 13A). Betrachtete man den Anteil Beta7⁺ und CD4⁺ Zellen der CCR4⁺FOXP3⁺ T-Zellen, dann waren signifikante Unterschiede zwischen dem peripheren Blut (GK 12,61% (2,57-30,6%), MC 8,614% (2,18-16,3%)) und dem mesenterialen Lymphknoten (GK 25,97% (21,4-33,1%), MC 29,14% (2,58-50,9%)) bei den Gesunden und der Morbus Crohn-Gruppe zu erkennen. Im mesenterialen Lymphknoten ist der Anteil dieser Zellpopulation bei beiden Gruppen signifikant höher als im peripheren Blut (s. Abb. 13B).



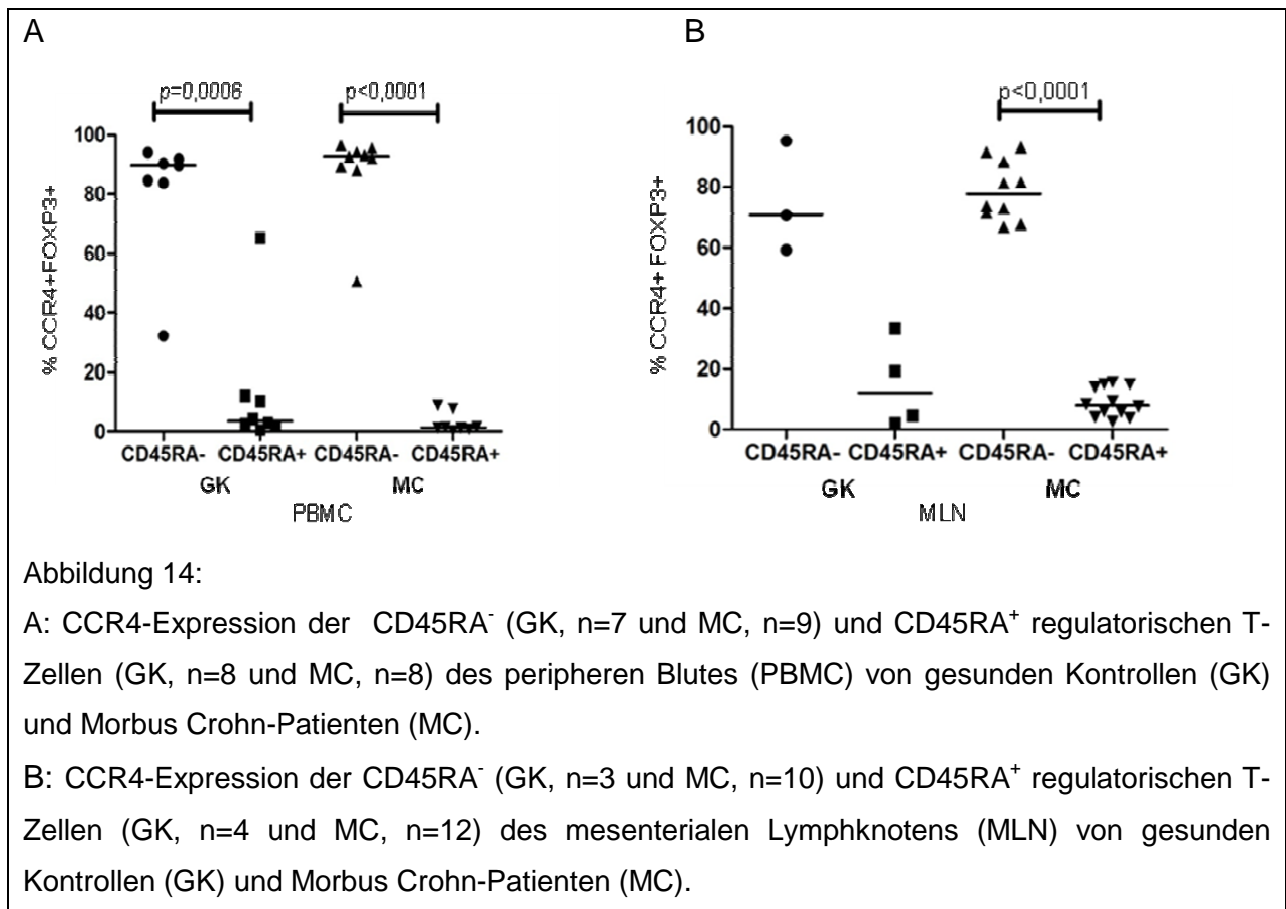
4.1.5 CD45RA-Expression

CD45 ist bei der Aktivierung von T- und B-Lymphozyten beteiligt. Um Hinweise auf die Migration regulatorischer T-Zellen und ihren Phänotyp zu gewinnen, wurde CD45RA analysiert, das naive T-Zellen charakterisiert (Hoffmann u. a. 2006). Sowohl bei der gesunden als auch bei der Morbus Crohn-Gruppe waren im peripheren Blut deutlich

mehr CD45RA⁻ T-Zellen als CD45RA⁺ (naive) T-Zellen zu finden. Die CD45RA⁻ T-Zellen korrespondierten zu CD45RO⁺ (memory) T-Zellen.

Im peripheren Blut konnte beim Vergleich naiver (CD45RA⁺ T-Zellen) und „Memory“ T-Zellen (CD45RA⁻ T-Zellen) der CCR4⁺ regulatorischen T-Zellen eine signifikant starke Anreicherung von CD45RA⁻ regulatorischen T-Zellen bei Morbus Crohn (MC 87,98% (50,6-96,4%)) als auch bei der gesunden Kontrollgruppe (GK 80,93% (32,4-94%)) festgestellt werden. Die naiven Zellen (CD45RA⁺ T-Zellen) lagen bei deutlich niedrigeren Werten (MC 2,96% (0,33-8,96%), GK 12,57% (0,7-65,4%)) (s. Abb. 14A).

Im mesenterialen Lymphknoten war bei Morbus Crohn ähnlich zu den PBMCs ein signifikanter Unterschied der CD45RA⁻ zu den CD45RA⁺ T-Zellen der CCR4⁺ regulatorischen T-Zellen festzustellen (MC: CD45RA⁻ 78,92% (66,9-93,1%), CD45RA⁺ 8,981% (2,6-15,7%)). Der deutliche in der Abbildung 14B dargestellte Unterschied in der gesunden Kontrolle (GK: CD45RA⁻ 75,07% (59,2-95,2%), CD45RA⁺ 14,97% (2,26-33,4%)) war nicht signifikant.



4.1.6 Unterschiede im Expressionsniveau von FOXP3

Für die Charakterisierung von regulatorischen T-Zellen hat sich bisher FOXP3 als bester Marker herausgestellt (Saruta u. a. 2007).

Regulatorische T-Zellen unterscheiden sich in ihrem Expressionsniveau für FOXP3 (Miyara u. a. 2009). Dies konnte bei phänotypischen Analysen bestätigt werden. Es wurde eine wenig FOXP3-exprimierende (FOXP3^{lo}) von einer stark FOXP3-exprimierenden (FOXP3^{hi}) Population unterschieden.

In der gesunden Kontrolle unterschieden sich die Populationen von T-Zellen signifikant, die wenig FOXP3 exprimieren (FOXP3^{lo} 1,972% (1,5-2,5%)) und denen, die stark FOXP3 (FOXP3^{hi} 0,812% (0,5-1,06%)) exprimierend sind, wobei die wenig FOXP3 exprimierenden überwiegen. Bei Morbus Crohn war dieser Unterschied auch sichtbar, allerdings nicht signifikant (FOXP3^{lo} 1,216% (0,57-1,78%), FOXP3^{hi} 0,4086% (0,043-1,67%)) (s. Abb. 15A).

Im mesenterialen Lymphknoten waren die Unterschiede zwischen den Gesunden und der Morbus Crohn-Gruppe nicht so stark ausgeprägt (GK: FOXP3^{lo} 5,758% (3,04-8,59%), FOXP3^{hi} 2,973% (1,65-6,02%); MC: FOXP3^{lo} 5,306% (3,57-7,05%), FOXP3^{hi} 2,172% (1,09-3,27%)) (s. Abb. 15B).

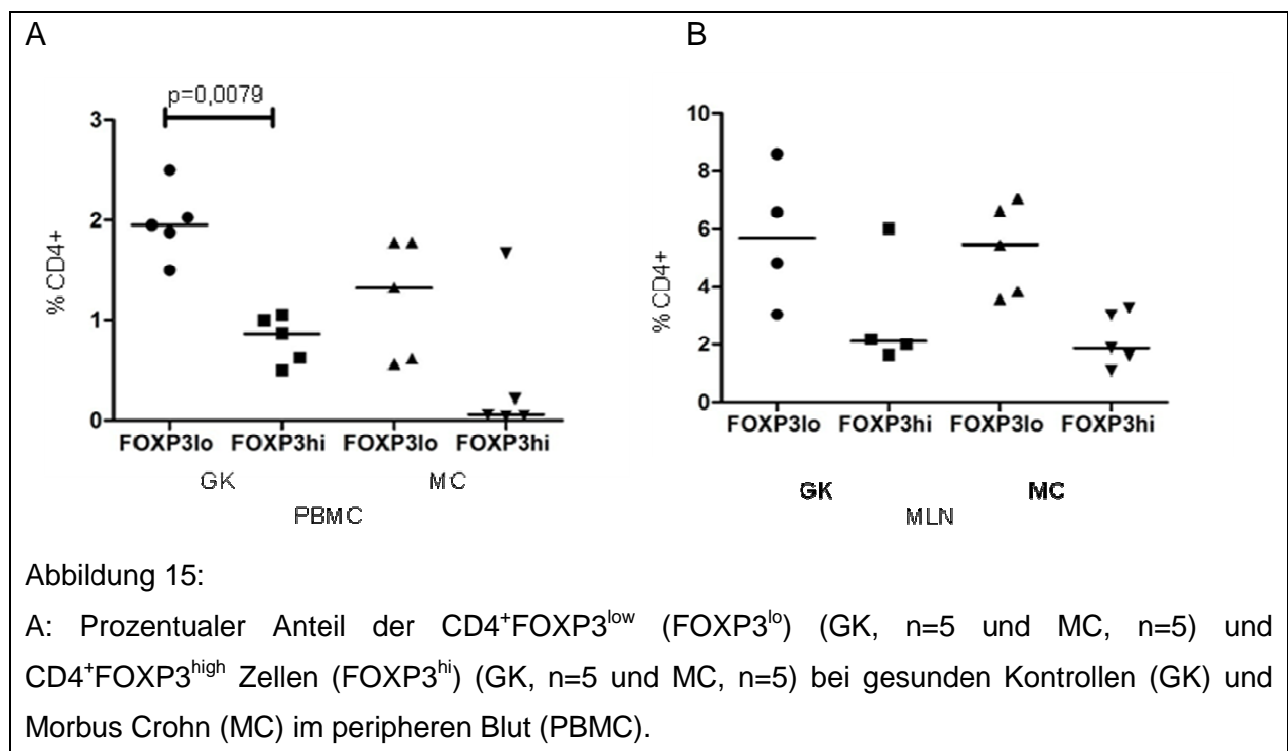


Abbildung 15:

A: Prozentualer Anteil der CD4⁺FOXP3^{low} (FOXP3^{lo}) (GK, n=5 und MC, n=5) und CD4⁺FOXP3^{high} Zellen (FOXP3^{hi}) (GK, n=5 und MC, n=5) bei gesunden Kontrollen (GK) und Morbus Crohn (MC) im peripheren Blut (PBMC).

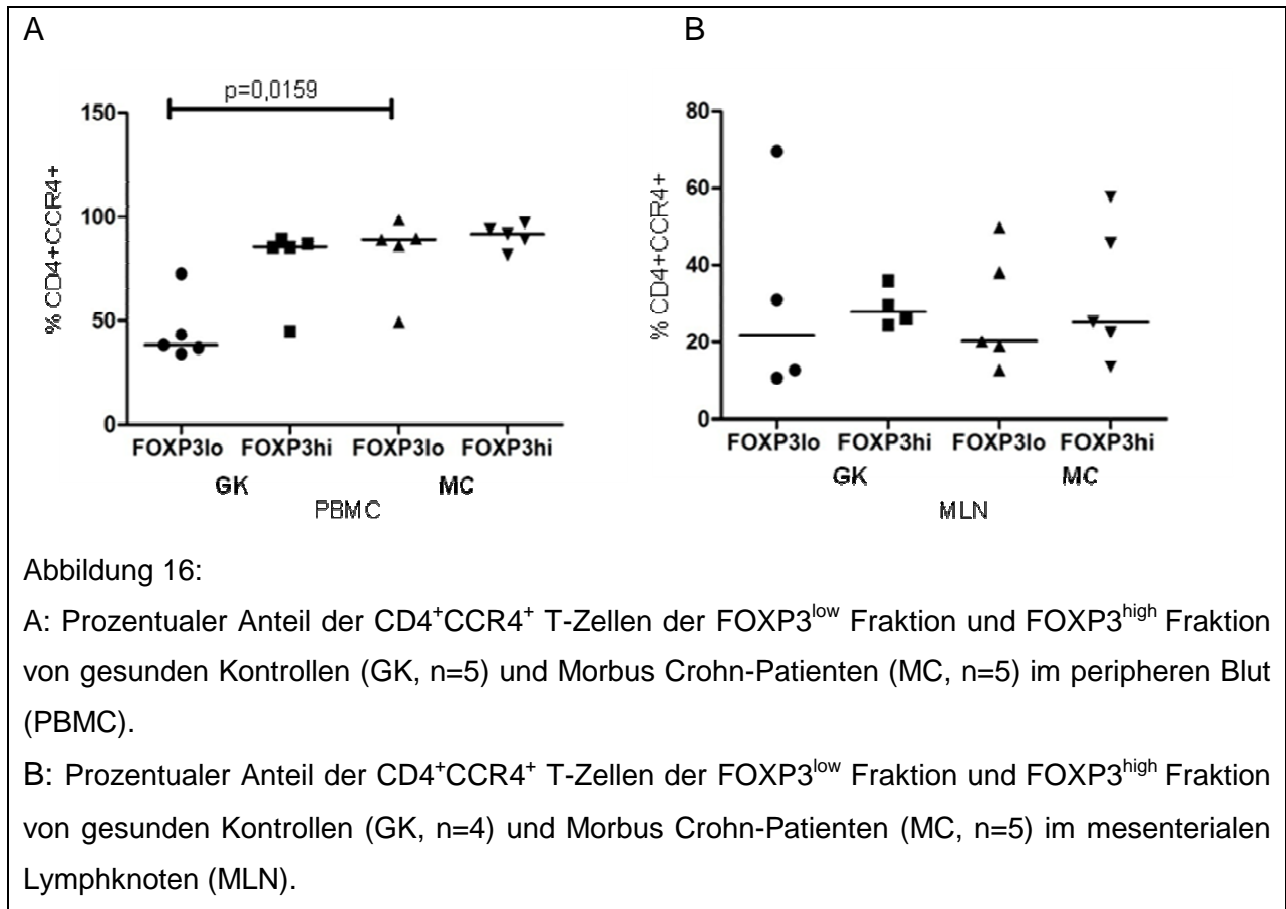
Ergebnisse

B: Prozentualer Anteil CD4⁺FOXP3^{low} (GK, n=4 und MC, n=5) und CD4⁺FOXP3^{high} Zellen (GK, n=4 und MC, n=5) bei gesunden Kontrollen (GK) und Morbus Crohn (MC) im mesenterialen Lymphknoten (MLN).

Um weiterhin Erkenntnisse über das Chemokin CCR4 und eine möglicherweise gestörte chemokinabhängige Migration regulatorischer T-Zellen zu erhalten, wurden auch die unterschiedlichen FOXP3-Fraktionen auf CCR4 hin untersucht.

In der Gruppe der geringen FOXP3-Expression war der Anteil an CCR4⁺ T-Zellen im peripheren Blut bei Morbus Crohn (MC: FOXP3^{lo} 82,54% (49,3-98,5%)) signifikant höher als bei den Gesunden (GK: FOXP3^{lo} 44,94% (34-72,5%)) (s. Abb. 16A). Betrachtete man die CCR4⁺ T-Zellen in der FOXP3^{high} Fraktion, war nur eine geringe Erhöhung bei Morbus Crohn (MC: FOXP3^{hi} 90,68% (81,5-97%)) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (GK: FOXP3^{hi} 78,52% (44,7-89,5%)) festzustellen.

Die Fraktion der CD4⁺CCR4⁺ T-Zellen in der FOXP3^{low} Gruppe und FOXP3^{high} Gruppe zeigte im mesenterialen Lymphknoten keinen Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. Die stark FOXP3-exprimierenden Zellen waren prozentual etwas mehr (GK 29,08% (24,6-35,9%), MC 32,94% (13,6-57,7%)) als die wenig FOXP3 exprimierenden (GK 30,95% (10,7-69,4%), MC 27,96% (12,7-49,8%)), sowohl bei Morbus Crohn-Patienten als auch bei der gesunden Kontrolle (s. Abb. 16B).

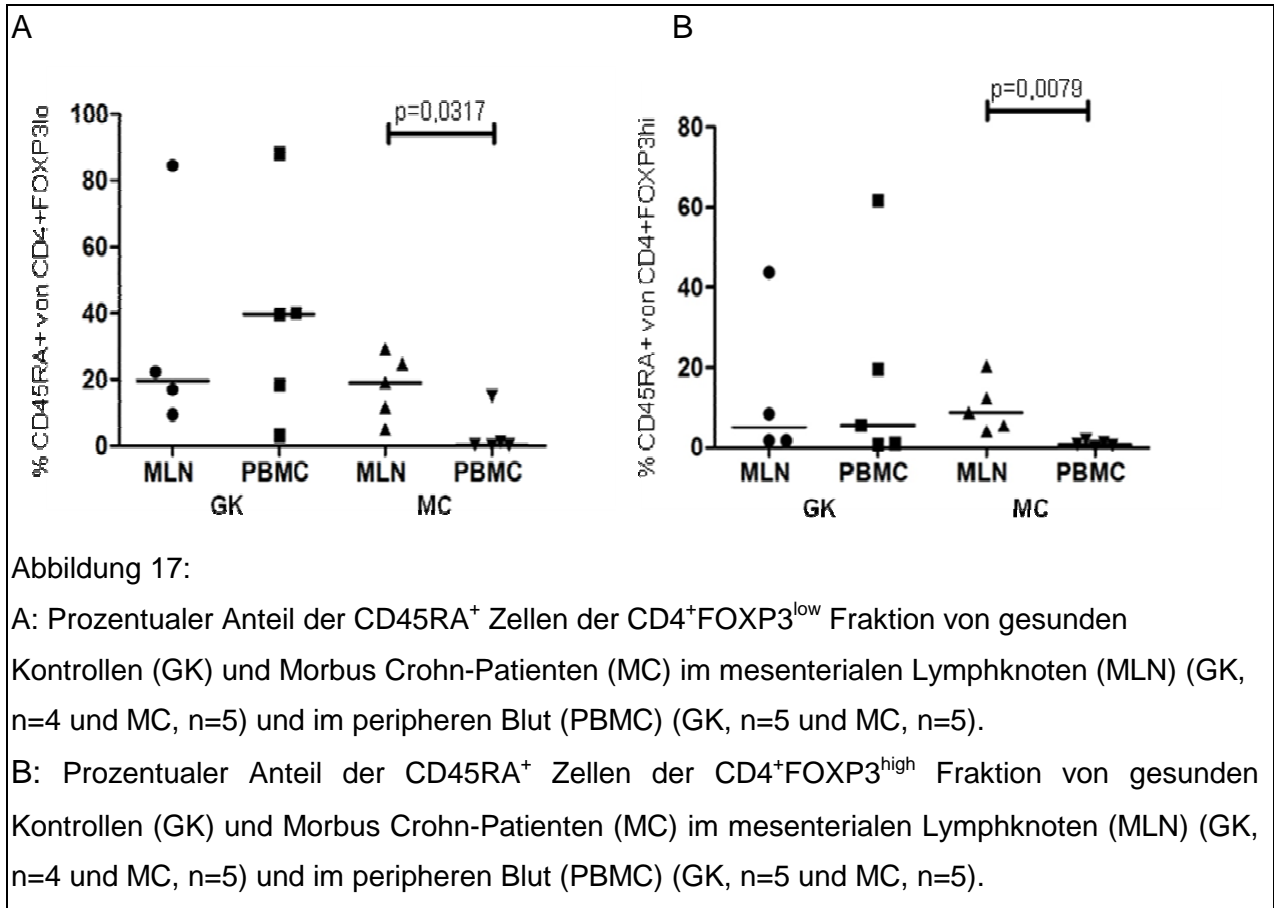


Wichtig für unsere Ergebnisse war auch die Information, ob die regulatorischen T-Zellen, die sich in ihrem Expressionsniveau von FOXP3 unterschieden, auch in ihrem Aktivitätszustand voneinander abheben.

Bei der Betrachtung der CD45RA⁺ T-Zellen, die wenig FOXP3 exprimieren, gab es prozentual eine signifikante Anreicherung im mesenterialen Lymphknoten von Morbus Crohn-Patienten (MC 18,03% (5,15-29,3%)) im Vergleich zum peripheren Blut (MC 3,428% (0,22-15%)). In der gesunden Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (GK: MLN 33,34% (9,47-84,5%), PBMC 37,99% (3,27-88,2%)) (s. Abb. 17A).

Bei der Betrachtung der CD45RA⁻ T-Zellen, die viel FOXP3 exprimieren, waren die Anteile sowohl im peripheren Blut (GK 17,78% (0,8-61,8%), MC 0,954% (0,24-1,9%)) als auch im mesenterialen Lymphknoten sehr gering (GK 13,94% (1,79-43,8%), MC 10,22% (4,2-20,3%)).

Dennoch war bei den Morbus Crohn-Patienten eine Anreicherung dieser Population im mesenterialen Lymphknoten zu zeigen. Der Unterschied zum geringeren Anteil im peripheren Blut war signifikant (s. Abb. 17B).



4.2 Migrationsversuche

Der Arbeitshypothese „Morbus Crohn ist Folge einer verringerten Anzahl regulatorischer T-Zellen aufgrund verminderter Migration in den Darm durch reduzierte CCR4-Rezeptorexpression“ sollte durch Migrationsassays nachgegangen werden.

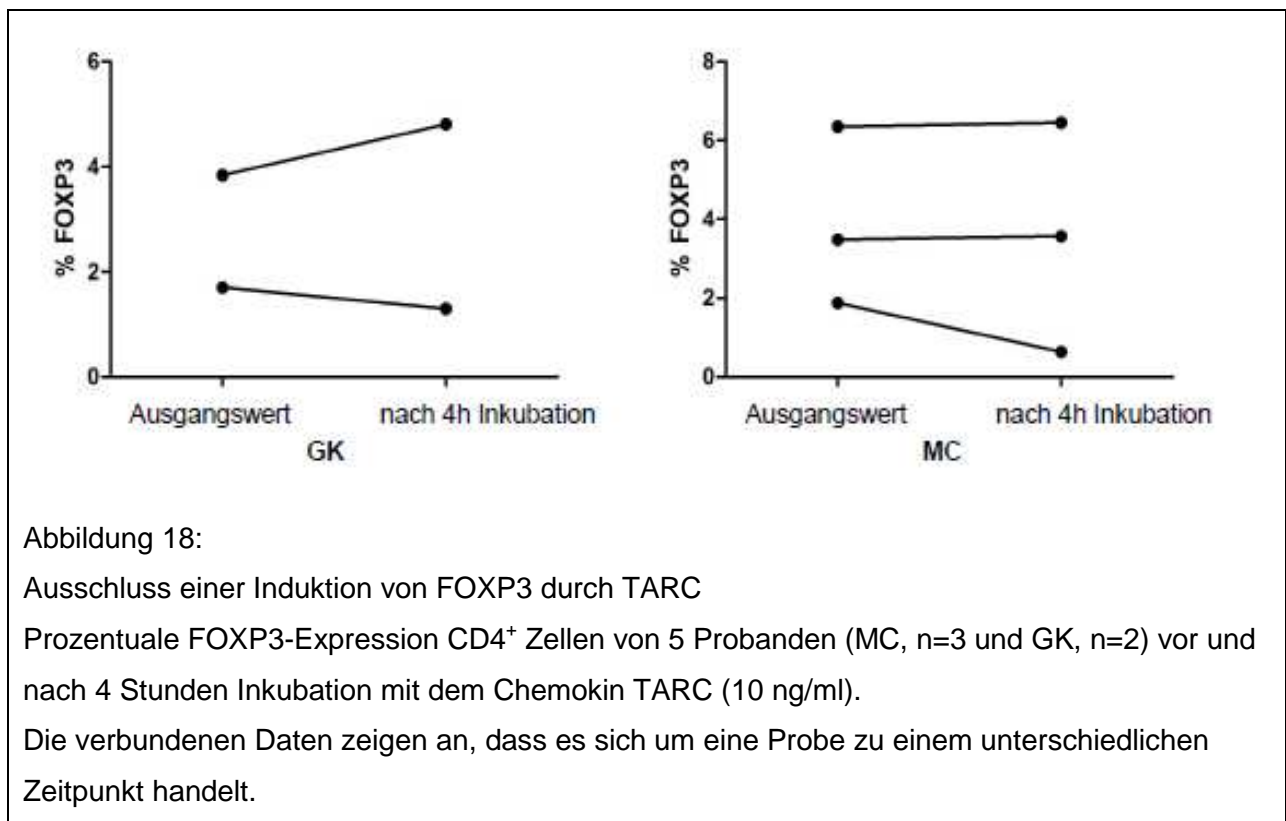
Bei den Versuchen wurde TARC als spezifischer Ligand für CCR4 verwendet und die aktive Migration regulatorischer T-Zellen hin zu diesem Liganden untersucht.

Zuvor wurde durch Versuche sichergestellt, dass CCR4 nicht durch TARC induziert wird, sondern von einer spezifischen Migration CCR4⁺ regulatorischer T-Zellen ausgegangen werden kann.

4.2.1 Induktion von FOXP3 oder CCR4 durch TARC

Im Weiteren wurde untersucht, ob der Ligand TARC den Chemokinrezeptor CCR4 oder den Transkriptionsfaktor FOXP3 *in-vitro* induzieren kann. Dazu wurden T-Zellen mit 10 ng/ml TARC inkubiert und der Anteil an CD4⁺FOXP3⁺ Zellen vor und nach der Inkubation durchflusszytometrisch bestimmt (s. Abb. 18). Ebenso wurde der Anteil CD4⁺CCR4⁺ Zellen (3 MC und 3 GK) analysiert (s. Abb. 19).

Es zeigte sich im Vergleich zum Ausgangswert (GK 2,77% und MC 3,093%) durch Inkubation mit 10 ng/ml TARC keine wesentliche Veränderung des durch FACS-Analysen gemessenen Anteils an FOXP3⁺ T-Zellen (GK 3,055% und MC 3,553%).



Auch bei den CD4⁺CCR4⁺ Zellen zeigte sich keine signifikante Veränderung des prozentualen Anteils vor (GK 13,5% und MC 13,87%) und nach der Inkubation mit TARC (GK 15,6% und MC 14,63%).

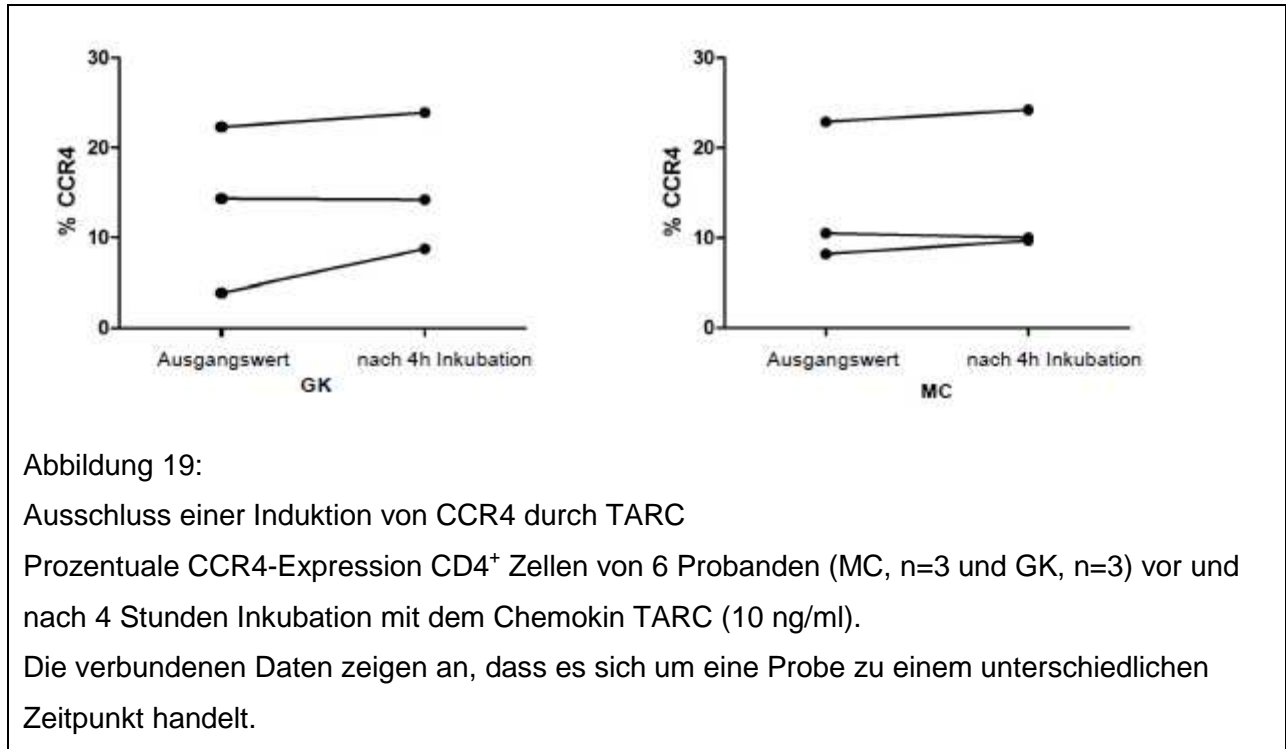


Abbildung 19:

Ausschluss einer Induktion von CCR4 durch TARC

Prozentuale CCR4-Expression CD4⁺ Zellen von 6 Probanden (MC, n=3 und GK, n=3) vor und nach 4 Stunden Inkubation mit dem Chemokin TARC (10 ng/ml).

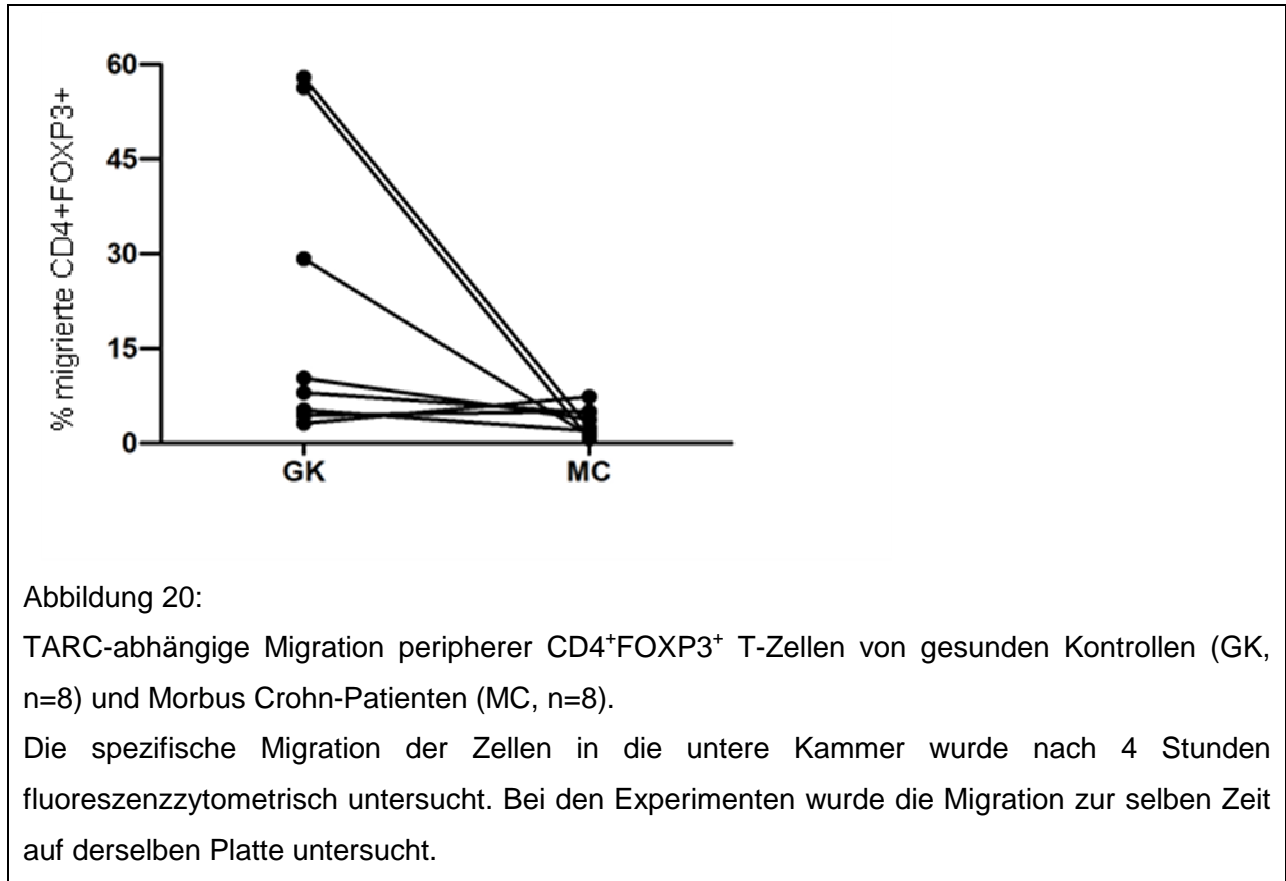
Die verbundenen Daten zeigen an, dass es sich um eine Probe zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt handelt.

4.2.2 Migration von CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen bei Morbus Crohn und Gesunden

Der hier verwendete Migrationsassay ist ein etabliertes Modell zur Untersuchung spezifischer aktiver Migrationsvorgänge von T-Zellen (Fu u. a. 2004).

Hierbei wurden durch eine MACS-Sortierung aus peripherem Blut oder mesenterialen Lymphknotenzellen gewonnene CD4⁺ T-Zellen verwendet. Es wurden Migrationsversuche mit CD4⁺ T-Zellen von Morbus Crohn-Patienten (MC) und gesunden Kontrollperson (GK) zeit- und ortgleich durchgeführt (s. Abb. 20). Prozentual war die Migration von CD4⁺ FOXP3⁺ T-Zellen hin zu einem Medium mit 10 ng/ml TARC bei 6 von 8 Versuchen von Morbus Crohn-Patienten (MC 3,435% (0,73-7,38%)) schlechter als bei der gesunden Kontrolle (GK 21,83% (3,16-57,93%)).

Die verbundenen Daten zeigen an, dass der Versuch mit je einem Morbus Crohn-Patienten und einem gesunden Probanden zeitgleich und auf derselben Well-Platte durchgeführt wurde.



4.2.3 Vergleich der Migration vor und nach der Infusion mit Infliximab (IFX)

Bei der Auswertung oben genannter Assays wurde bei Morbus Crohn-Patienten eine bessere Migration der regulatorischen T-Zellen gemessen, nachdem der Patient eine Infusion von Infliximab (IFX) (Remicade®), eines Antikörpers gegen TNF α , erhalten hatte.

In 5 von 7 Versuchen migrierten prozentual mehr CD4⁺ FOXP3⁺ T-Zellen nach der Infusion mit Infliximab als vorher (MC vor Infliximab-Infusion 11,64% (3,75-26,07%) und MC nach der Infliximab-Infusion 30,19% (3,55-96,06%)) (s. Abb. 21).

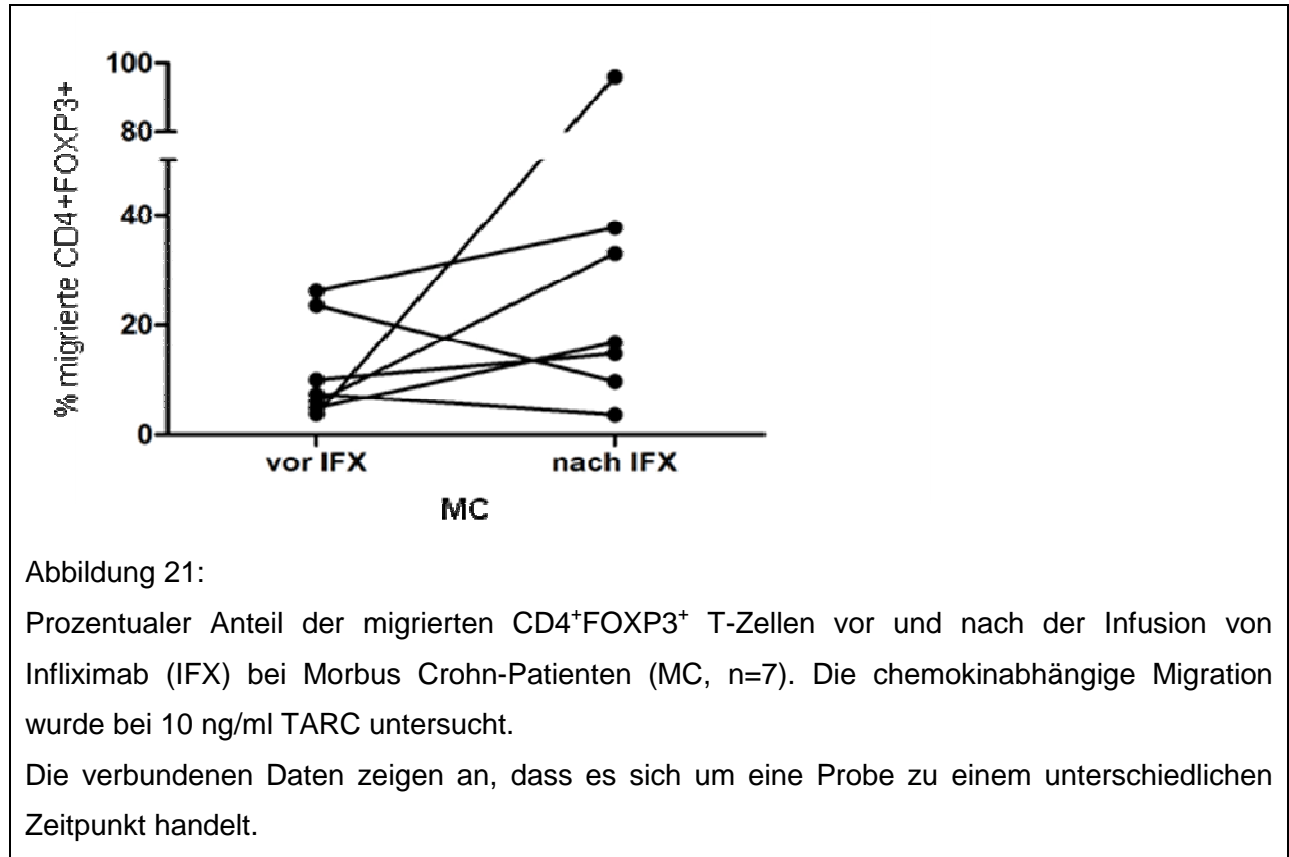


Abbildung 21:

Prozentualer Anteil der migrierten CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen vor und nach der Infusion von Infliximab (IFX) bei Morbus Crohn-Patienten (MC, n=7). Die chemokinabhängige Migration wurde bei 10 ng/ml TARC untersucht.

Die verbundenen Daten zeigen an, dass es sich um eine Probe zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt handelt.

Durch eine auffällige Migrationsverbesserung regulatorischer T-Zellen nach der Infusion von Infliximab sollte nun auch die Dichte von CCR4 untersucht werden, um Rückschlüsse auf die CCR4-abhängige Migration zu erhalten.

Die mittlere Fluoreszenzintensität von CCR4 auf regulatorischen T-Zellen wurde durch die Infusion des TNF α -Inhibitors Infliximab nicht signifikant verändert (MC vor IFX 26,71 (3,3-39,25); (MC nach IFX 23,16 (4,27-39,7)) (s. Abb. 22).

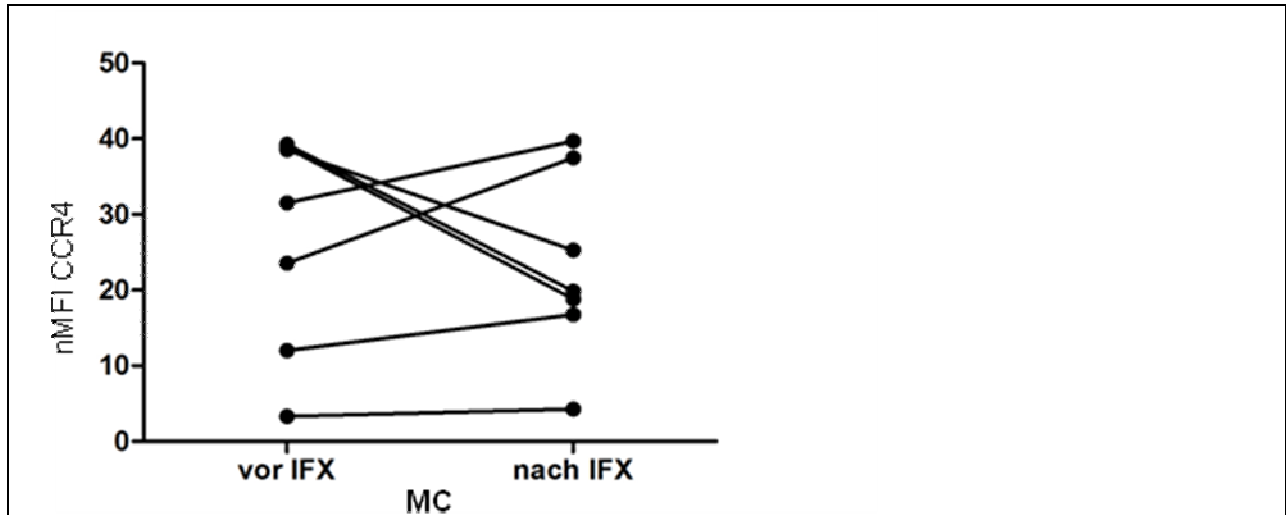


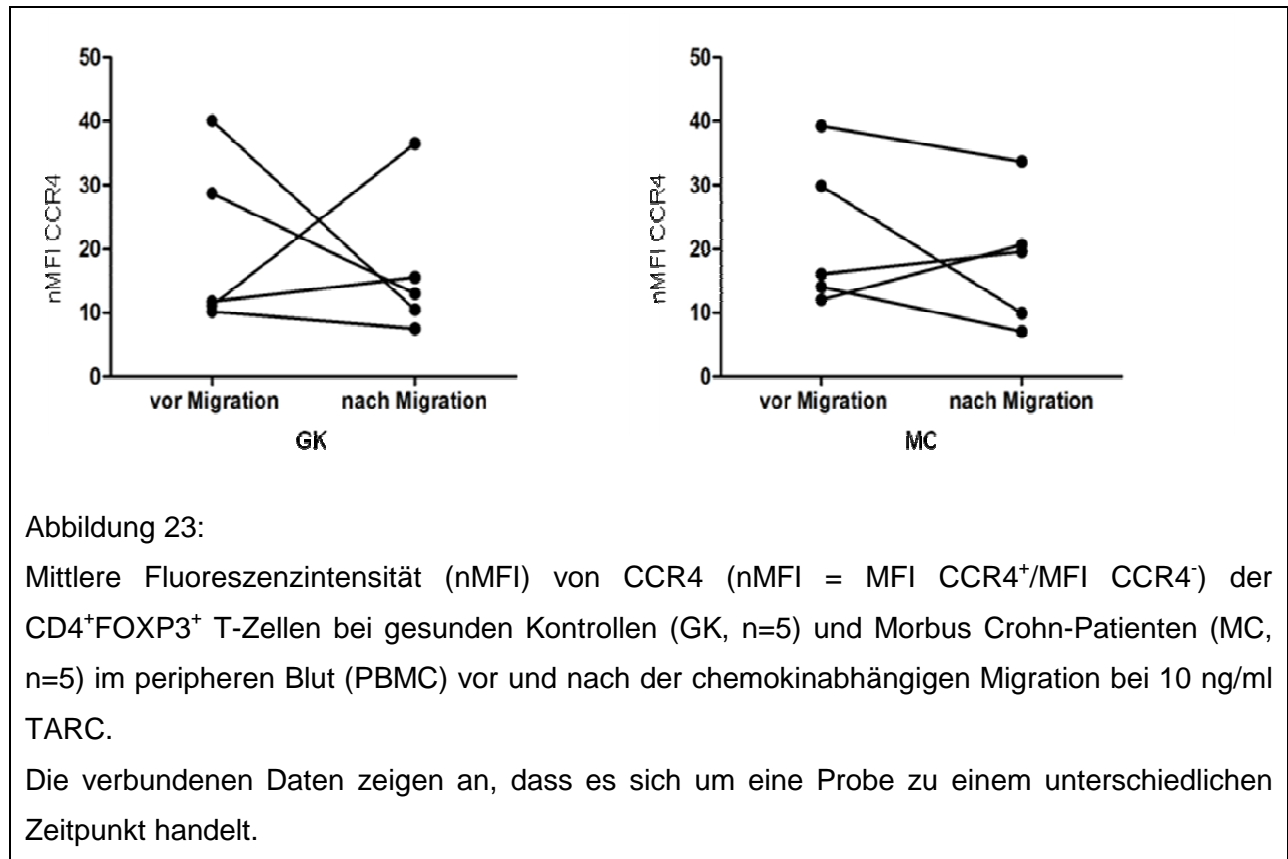
Abbildung 22:

Mittlere Fluoreszenzintensität (nMFI) von CCR4 ($nMFI = MFI\ CCR4^+ / MFI\ CCR4^-$) der $CD4^+FOXP3^+$ T-Zellen vor und nach der Infusion von Infliximab (IFX) bei Morbus Crohn-Patienten (MC, n=7).

Die verbundenen Daten zeigen an, dass es sich um eine Probe zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt handelt.

Es konnte keine Veränderung der Dichte von CCR4 durch Infliximab festgestellt werden. Deshalb war weiter die Frage von Interesse, wie sich die mittlere Fluoreszenzintensität von CCR4 (nMFI CCR4) auf regulatorischen T-Zellen vor und nach der Migration regulatorischer T-Zellen verhält. Auch hier waren weder bei Morbus Crohn-Patienten (MC: nMFI CCR4 vor Migration 22,24 (12-39,25) und nMFI CCR4 nach der Migration 18,2 (7,08-33,67)) noch bei der gesunden Kontrolle wesentliche Unterschiede festzustellen (GK: nMFI CCR4 vor Migration 20,38 (10,17-40,11) und nMFI CCR4 nach der Migration 16,61 (7,5-36,52)) (s. Abb. 23).

Ergebnisse



5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte der Tatsache nachgegangen werden, dass es Unterschiede im Phänotyp regulatorischer T-Zellen von Morbus Crohn-Patienten und Gesunden gibt. Es wurden verschiedene Oberflächenmarker verglichen.

Außerdem finden sich im entzündeten Gewebe von Morbus Crohn-Patienten weniger regulatorische T-Zellen als bei entzündlichen Kontrollen (Maul u. a. 2005). Hierzu wurden Migrationsassays durchgeführt, um Aufschlüsse über die spezifische Wanderung dieser Zellen bei Morbus Crohn-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen zu erhalten.

5.1 Unterschiede im Phänotyp von T-Zellen bei Morbus Crohn versus Gesunden

Chemokinrezeptor CCR4:

Der Chemokinrezeptor CCR4 wurde zunächst als Marker für die spezifische Wanderung von T-Zellen in der Haut angesehen. Heute gilt er als wichtiger Rezeptor für Wanderungsvorgänge von T-Zellen generell und insbesondere zum Ort der Entzündung (Yuan u. a. 2007).

Regulatorische T-Zellen, die kein CCR4 auf der Oberfläche haben, waren in einem Mausmodell nicht in der Lage, adäquat in Lymphknoten einzuwandern und konnten trotz *in-vitro* nachgewiesener Supressorfunktion Darmentzündungen nicht verhindern (Yuan u. a. 2007). CCR4 wird daher als wichtiger Rezeptor für die funktionale Aktivität von regulatorischen T- Zellen angesehen.

Bei den hier vorgelegten Analysen wurde nachgewiesen, dass bezogen auf die T-Zell-Population bei Morbus Crohn-Patienten und gesunden Probanden ein höherer relativer Anteil CCR4⁺ regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut als in mesenterialen Lymphknoten befindet.

Mögliche Ursache für die von Maul und Mitarbeitern 2005 beschriebene verminderte Anzahl regulatorischer T-Zellen im Darm von Morbus Crohn-Patienten könnte eine verminderte Dichte von CCR4-Rezeptoren auf deren Oberfläche sein. Damit im Einklang zeigte sich im peripheren Blut eine signifikante Verringerung der mittleren Fluoreszenzintensität von CCR4 auf regulatorischen T-Zellen von Morbus Crohn-

Patienten im Vergleich zu Gesunden. Die hier beobachtete verminderte Dichte von CCR4 auf regulatorischen T-Zellen bei Morbus Crohn stützt die Hypothese, dass regulatorische T-Zellen wegen verminderter Chemokinrezeptorexpression nicht zum Ort der Entzündung gelangen können.

Interessanterweise war dieser Unterschied bei den Untersuchungen in mesenterialen Lymphknoten nicht nachweisbar. Jedoch bestand eine große Streuung bei den untersuchten Probanden. Aufgrund der eigenen Ergebnisse ist demnach nicht von einer verminderten CCR4-Expression in mesenterialen Lymphknoten auszugehen. Die Daten sprechen eher für eine fehlerhafte Aktivierung in der Peripherie.

Die Untersuchungen zur Dichte von CCR4 auf regulatorischen T-Zellen vor und nach *in-vitro* Migrationsassays zeigten keinen signifikanten Unterschied.

Chemokinrezeptor CD62L:

CD62L ist ein weiterer wichtiger Chemokinrezeptor für das Zirkulieren und Wandern von T-Zellen in Lymphknoten. Bei Morbus Crohn sind CD4⁺CD45RO⁺ Zellen, die CD62L tragen, vermindert (de Tena u. a. 2006).

FOXP3⁺ Zellen, die in nicht lymphatisches Gewebe migrieren, sind CD62L⁻, während die CD62L⁺ Zellen in sekundär lymphatischen Geweben zu finden sind (Lee u.a. 2007). CD62L -exprimierende FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen behalten auch nach Expansion supprimierende Aktivität (Hoffmann u. a. 2006). Durch CD62L kann die CD4⁺FOXP3⁺ Fraktion in eine stärker supprimierende (CD62L⁺) und eine weniger aktive Gruppe (CD62L⁻) unterteilt werden. Außerdem zeigen die CD62L⁺ regulatorischen T-Zellen eine stärkere chemokinabhängige Migration zu sekundär lymphatischen Organen (Fu u. a. 2004).

Bei eigenen Analysen war der Anteil der CD62L⁺ regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut Gesunder signifikant erhöht im Gegensatz zu denen bei Morbus Crohn-Patienten. Die verminderte chemokinabhängige Migration regulatorischer T-Zellen bei Morbus Crohn wird wahrscheinlich neben dem Chemokinrezeptor CCR4 auch durch CD62L verursacht.

Integrin Alpha4 Beta7:

Integrine wie Alpha4Beta7 sind Transmembranproteine, die die Signalübermittlung zwischen Zellen, sowie zwischen einer Zelle und ihrem Milieu übermitteln. Alpha4Beta7 ist ein heterodimeres Molekül, das die gerichtete Migration von Lymphozyten aus dem Gefäßsystem in lymphatische Organe und an den Ort einer Entzündung mitbestimmt (Wang u. a. 2010). Auch für die Ortsständigkeit immunologischer Zellen im lymphatischen Gewebe des Darmes spielt es eine entscheidende Rolle (Berin u. a. 2001).

In den vorliegenden Ergebnissen musste die Färbung durch reduzierte technische Möglichkeiten nur mit der Beta-Untereinheit Beta7 ohne Alpha4 durchgeführt werden.

Es zeigte sich sowohl bei Morbus Crohn als auch bei den Gesunden eine signifikante Anreicherung Beta7⁺ regulatorischer T-Zellen im mesenterialen Lymphknoten. Die große Streuung der Ergebnisse unterstreicht, dass die Erkrankung Morbus Crohn nicht als einheitliche Entzündungsreaktion angesehen werden kann, sondern sich individuell und zeitlich unterschiedlich präsentiert.

Es ist wahrscheinlich, dass regulatorische T-Zellen im lymphatischen Gewebe diesen Marker erstmals exprimieren, um dann gezielt zum Ort der Entzündung zu gelangen (Grindebacke u. a. 2009).

Grindebacke und Mitarbeiter zeigten, dass regulatorische T-Zellen von einem naiven Zelltypus in einen Gedächtnistyp wechseln können. Die naiven Zellen tragen vor allem das Integrin Alpha4 Beta7, welches zur Migration in den Darm befähigt (Grindebacke u. a. 2009). Möglicherweise wird bei diesen Zellen erst Beta7 exprimiert und sie verändern dann ihre Oberflächenmarker hin zu CCR4 und einem Gedächtnistyp (Grindebacke u. a. 2009).

Neben dem Integrin Alpha4Beta7 ist auch das mukosale Zell-Adhäsionsmolekül (MadCAM, mucosal addressin cell adhesion molecule (MadCAM)) an der Leukozytenmigration beteiligt (Thomas und Baumgart 2012). Die Migration von Effektorzellen und Gedächtnis-T-Zellen ist von der Interaktion des Alpha4 Beta7-Integrins mit MadCAM Proteinen abhängig. Das Integrin ist hierbei auf intraepithelialen Lymphozyten zu finden, während MadCAM auf intestinalem Endothel der Lamina propria vertreten ist (Apostolaki u. a. 2008). MadCAM-1 ist spezifisch im Gastrointestinaltrakt zu finden. Zusammen mit Beta7 ist es für die spezifische

Zirkulation von Lymphozyten im Darm notwendig (Berin u. a. 2001). Auf Venolen vorhandenes MadCAM trägt zusammen mit weiteren Chemokinen zum Austreten der Zellen aus dem Blutkreislauf in Entzündungsgebiete des Darmes bei (Farkas u. a. 2006).

Transmembranprotein CD45RA/RO:

CD45 ist ein Leukozyten-Antigen, das funktionell eine Tyrosin-Phosphatase darstellt. Die genaue Funktion der verschiedenen, durch „alternatives Splicing“ entstandenen Isoformen des CD45-Komplexes ist allerdings noch nicht vollständig verstanden (Tchilian und Beverley 2002). T-Zellen, die noch nicht mit ihrem spezifischen Antigen in Kontakt kamen, werden als naiv bezeichnet und tragen auf ihrer Oberfläche CD45RA. Um auf ein spezifisches Antigen zu treffen, zirkulieren diese Zellen kontinuierlich zwischen dem Blut und sekundär lymphatischen Organen (Lee u.a. 2007).

CD45RO ist ein Marker für T-Gedächtniszellen, die nach erneuter Exposition mit ihrem Antigen direkt Zytokine sezernieren können. Diese Population rezirkuliert zwischen Geweben, vorrangig der Haut und der intestinalen Lamina propria (de Tena u. a. 2006). Es wird davon ausgegangen, dass die Veränderung von CD45RA zu CD45RO intestinaler regulatorischer T-Zellen im Darm stattfindet und diese dann als Memory-Zellen in die Peripherie gelangen (Lee u.a. 2007). Kürzlich konnte beschrieben werden, dass periphere regulatorische T-Zellen in den ersten Lebensjahren von einem naiven Typ in einen „Gedächtnistyp“ mit CCR4-Expression wechseln (Grindebacke u. a. 2009).

In den eigenen Untersuchungen konnten im peripheren Blut signifikant mehr CD45RA⁻ regulatorische T-Zellen nachgewiesen werden als CD45RA⁺ T-Zellen.

Interessanterweise und zu den Migrationsvorgängen passend, war auch im mesenterialen Lymphknoten sowohl bei Gesunden als auch bei Morbus Crohn-Patienten eine Anreicherung von CCR4⁺ Memory-/Effektor-Zellen (CD45RA⁻ Zellen) festzustellen

Es ist nicht eindeutig zu sagen, wo regulatorische T-Zellen ihren Typ von naiv zu Gedächtnis-T-Zelle verändern und welche Rolle in diesem Prozess die mesenterialen Lymphknoten spielen. Vielleicht dienen sie als eine Art Station zur „Speicherung“ dieses Zelltyps, um im Bedarfsfall bei einer akuten Entzündung sofort vor Ort sein zu können.

Unterschiedliche FOXP3-Expression regulatorischer T-Zellen:

2009 wurde festgestellt, dass es beim Menschen zwei Unterklassen von CD4⁺FOXP3⁺ Zellen gibt: Zellen, die stark FOXP3-exprimierend sind (FOXP3^{high}) und wenig FOXP3-exprimierende Zellen (FOXP3^{low}) (Miyara u. a. 2009).

Zusätzlich wurde die FOXP3^{low} Gruppe anhand von CD45RA in Zytokin-bildende Zellen (CD45RA⁻ Zellen) und ruhende Zellen (CD45RA⁺ Zellen) eingeteilt. Ob und wie diese Gruppen ineinander übergehen, oder ob sie durch ein unterschiedliches Zytokinmuster Immunantworten regulieren können, muss noch untersucht werden (Miyara u. a. 2009). Nur die ruhenden (CD45RA⁺FOXP3^{low} Zellen) und die aktivierten (CD45RA⁻FOXP3^{high} Zellen) Zellen zeigten supprimierende Aktivität (Miyara u. a. 2009).

Auch in der hier vorgelegten Arbeit konnten verschiedene FOXP3-Populationen identifiziert werden (s. Tab. 6).

	CD4 ⁺ Zellen bei MC
FOXP3 ^{high}	↓
FOXP3 ^{low}	↓
CD45RA ⁺ FOXP3 ^{low}	↓
CD45RA ⁻ FOXP3 ^{high}	↓

Tabelle 6: Expression verschiedener Marker der CD4⁺ T- Zellen bei Morbus Crohn-Patienten (MC) im peripheren Blut im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Es sind sowohl die FOXP3^{low} Zellen als auch die FOXP3^{high} Zellen bei Morbus Crohn-Patienten im peripheren Blut gegenüber denen bei Gesunden vermindert. Nach den obigen Erkenntnissen könnte das bedeuten, dass der Anteil an supprimierenden T-Zellen bei Morbus Crohn-Patienten vermindert ist. Im mesenterialen Lymphknoten ist dieser Unterschied zwischen Gesunden und Erkrankten nicht nachweisbar.

Der Anteil CD45RA⁺ Zellen der FOXP3^{low} Fraktion war bei Morbus Crohn im peripheren Blut stark vermindert. Außerdem war auffällig, dass bei den Gesunden weniger CD45RA⁺FOXP3^{low} Zellen im mesenterialen Lymphknoten als im peripheren Blut zu finden waren. Dies war bei den Morbus Crohn-Patienten genau umgekehrt. Demnach befinden sich im peripheren Blut Gesunder viele ruhende regulatorische T-Zellen,

während bei Morbus Crohn-Patienten diese vermehrt im mesenterialen Lymphknoten zu finden sind. Es ist unklar, ob das ein Resultat der chronischen Entzündung ist oder eine fehlerhafte Regulation der T-Zellen.

Bei Zellen mesenterialer Lymphknoten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Anteile CCR4⁺ Zellen in der FOXP3^{low} Fraktion und FOXP3^{high} Fraktion zwischen Morbus Crohn-Patienten und Gesunden. Bei der Betrachtung des Anteils CCR4⁺ regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut war dieser am geringsten bei der FOXP3^{low} Fraktion der Gesunden. Diese Ergebnisse deuten auf eine kontrollierte Immunreaktion regulatorischer T-Zellen bei Gesunden hin. CCR4 ermöglicht die Migration zum Ort der Entzündung, was für die supprimierenden T-Zellen (FOXP3^{high}) von entscheidender Bedeutung ist. CCR4 wird bei Morbus Crohn in den beschriebenen Populationen etwa gleich stark exprimiert. Eine hohe Expression von CCR4 in der FOXP3^{low} Fraktion bei Morbus Crohn-Patienten könnte durch eine fehlerhafte Stimulation bedingt sein. Von einer Hochregulation von FOXP3^{low} Zellen, die keine supprimierende Aktivität haben ist bisher nicht auszugehen. Die Suppressionseigenschaft regulatorischer T-Zellen bei Morbus Crohn scheint intakt zu sein (Maul u. a. 2005).

5.2 Verminderte Migration regulatorischer T-Zellen bei Morbus Crohn

Bei den vorgestellten Migrationsexperimenten war bei Morbus Crohn-Patienten eine verminderte Migration von aus peripherem Blut isolierten CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen festzustellen.

Bei Morbus Crohn-Patienten finden sich wenig regulatorische T-Zellen am Ort der Entzündung. Die bessere Migration regulatorischer T-Zellen bei gesunden Probanden gegenüber Morbus Crohn-Patienten ist somit ein Hinweis auf eine fehlerhafte Zellrekrutierung oder Anhäufung im entzündeten Gewebe. Bei CED scheinen keine Einschränkungen in der Funktionalität der regulatorischen T-Zellen zu bestehen (Maul u. a. 2005).

Durch Färbungen für CD4 und FOXP3 konnte demonstriert werden, dass es keinen signifikanten Unterschied des prozentualen Anteils regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut zwischen gesunden und erkrankten Probanden gab. Aufgrund dieser vergleichbaren Häufigkeit regulatorischer T-Zellen kann vermutet werden, dass die

verminderte Expression von Chemokinrezeptoren für die gestörte Migration in das entzündliche Gewebe verantwortlich ist.

5.2.1 Migrationsversuche vor und nach Infliximab-Infusion

Beim Morbus Crohn scheint es eine Vermehrung von membranständigem TNF α zu geben (Mitoma u. a. 2005). Dieses Zytokin aktiviert Apoptosesignale, ist aber umgekehrt auch in der Lage, durch Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B, Apoptose zu verhindern. Welche Signale überwiegen, hängt vom Aktivitätsstatus der Zelle ab (Wong u. a. 2008).

Die Therapie mit einem TNF α -Antikörper wird in der Klinik bei Versagen anderer Therapieoptionen eingesetzt (Hoffmann und Zeitz 2002). Als proinflammatorisches Zytokin ist TNF α ursächlich an der Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung beteiligt. Bei Blutuntersuchungen von Morbus Crohn-Patienten, die mit TNF α -Antikörpern (Infliximab) therapiert wurden, konnte eine vermehrte Anzahl zirkulierender regulatorischer T-Zellen nach der Therapie festgestellt werden, welche supprimierende Eigenschaften auf Effektorzellen zeigten (Wong u. a. 2008). Außerdem kam es zu einer verminderten Zellinfiltration am Ort der Entzündung, wahrscheinlich durch veränderte Migrations- und Epithel-eigenschaften. Ein deutlicher Rückgang proinflammatorischer Zytokine wurde 2004 von Ringheanu und Mitarbeitern festgestellt. Hierfür ist unter anderem das „Reverse Signalling“, eine spezielle Form der Signaltransduktion in die Zelle verantwortlich, bei der ein Ligand als Rezeptor arbeitet (Ringheanu u. a. 2004). Auch an der epithelialen Barriere konnten Veränderungen festgestellt werden. Ist die fehlerhafte Barrierefunktion bei Morbus Crohn-Patienten Teil der Erkrankung, wurde eine Restitution nach Therapie gesehen (Wong u. a. 2008). Es wird deshalb angenommen, dass der Rückgang proinflammatorischer Zytokine (TNF α , IL-1 β , IL-6, und IL-8) den Zustand des Epithels verbessert (Hering und Schulzke 2009).

In der Arbeit von Ricciardelli und Mitarbeitern wurde 2008 gezeigt, dass eine TNF α -Antikörper-Therapie zu einem Anstieg regulatorischer T-Zellen führt. Hier wird die Besserung der chronischen Entzündung mit der erhöhten Anzahl regulatorischer T-Zellen, die zur entzündeten Mukosa gelangen, begründet (Ricciardelli u. a. 2008).

Ist membranständiges TNF α bei regulatorischen T-Zellen von Morbus Crohn-Patienten vermehrt, könnte dies die T-Zellen an der Migration in entzündliches Gewebe hindern. Die Infusion mit einem TNF α -Antikörper begünstigt in diesem Fall die Zellmigration durch Bindung an das Membran-gebundene TNF α (Ricciardelli u. a. 2008).

Auch Boschetti und Mitarbeiter wiesen eine gesteigerte Anzahl regulatorischer T-Zellen nach der Behandlung mit Anti-TNF α -Antikörpern im peripheren Blut nach und konnten sogar deren gesteigerte suppressive Funktion darstellen (Boschetti u. a. 2011).

Die oben vorgestellten Migrationsexperimente zeigten, dass regulatorische T-Zellen nach der Infusion von Infliximab bei Morbus Crohn in größerer Anzahl migrierten als vor der Infusion von Infliximab. Infliximab wirkt demnach sehr schnell auf periphere regulatorische T-Zellen. Dies könnte ein weiterer Wirkmechanismus der TNF α -Therapie sein.

5.3 Methodendiskussion

Häufig stellt sich die Frage, in wieweit *in-vitro* Ergebnisse auf das komplexe humane Immunsystem übertragbar sind. So ist beispielsweise die *in-vivo* Differenzierung regulatorischer T-Zellen im Darm von einem komplexen lokalen Milieu abhängig, das durch immunologische Faktoren, das intestinale Gewebe und die Mikrobiota beeinflusst wird.

Fu und Mitarbeiter demonstrierten, dass CD62L⁺ regulatorische T-Zellen stärkere supprimierende Aktivität aufweisen als CD62L⁻ T-Zellen. Außerdem wiesen sie eine gesteigerte Migrationsfähigkeit für diese Population sowohl bei *in-vitro* Migrationsversuchen, als auch *in-vivo* im Mausmodell nach (Fu u. a. 2004). Sie folgerten daraus, dass Migrationsassays eine geeignete *in-vitro* Methode für die Untersuchung der T-Zellmigration bei CED darstellen.

Die Migration regulatorischer T-Zellen zeigte in den hier vorgelegten Versuchen starke Schwankungen. Der Migrationsassay war sehr instabil. Dies macht den Vergleich der Daten schwierig und leider nicht immer reproduzierbar.

Allein schon die *ex-vivo* Kultivierung von Zellen beinhaltet die Gefahr, Artefakte zu erzeugen. Um dies möglichst zu vermeiden, wurden in den eigenen Analysen zur

oberflächlichen Zellstruktur keine eingefrorenen Zellen verwendet und die Proben direkt nach Erhalt verarbeitet. Bei den Untersuchungen wurde durch Kontrollen vor und nach kurzfristiger Lagerung der Zellen im Kühlschrank festgestellt, dass sich die Oberfläche der betroffenen Zellen nicht verändert. Es wurden dazu Zellreihen vor und nach der Lagerung auf identische Oberflächenstrukturen untersucht.

Die Anzahl der untersuchten Probanden war oft gering, was die Aussagekraft der Ergebnisse reduzierte. Dies war unter anderem dadurch begründet, dass mesenteriale Lymphknoten gesunder Kontrollen nur in sehr begrenztem Umfang verfügbar waren.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Durch die mittels Migrationsassays gewonnenen Ergebnisse konnte in dieser Arbeit eine gestörte Migrationsfähigkeit regulatorischer T-Zellen von Morbus Crohn-Patienten im peripheren Blut nachgewiesen werden.

Regulatorische T-Zellen erhalten in Bezug auf die Pathogenese von Immunerkrankungen einen immer wichtigeren Stellenwert. Die genaue Charakterisierung dieser T-Zell-Population bildet die Grundlage für das Verständnis der Krankheit und für mögliche Therapieansätze.

5.4.1 Therapie mit regulatorischen T-Zellen

In Japan wird Leukapherese, die gezielte Auswaschung von Leukozyten (v.a. Granulozyten und Monozyten) aus dem Blut, als eine Therapie bei Rheumatoider Arthritis, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn bei Versagen der medikamentösen Therapie angeboten. Es wird eine relevante Erhöhung von Lymphozyten, darunter auch die Population regulatorischer T-Zellen, nach der Therapie beschrieben (Saniabadi u. a. 2007).

Mit der Leukapherese gelingt es möglicherweise, die Imbalance zwischen der gesteigerten Anzahl an T-Effektorzellen und der zu geringen Anzahl regulatorischer T-Zellen im Darm bei CED zu minimieren (Nagase u. a. 2011) (Cuadrado 2009). Es sind

derzeit noch große Studien nötig, um den Effekt der Leukapherese bei Morbus Crohn zu evaluieren und das Verfahren zu vereinheitlichen (Abreu u. a. 2007).

Ein weiterer Therapieansatz besteht in der Aufreinigung, Expansion und Re-Infusion regulatorischer T-Zellen. Im Mausmodell konnten Taylor und Mitarbeiter schon 2002 zeigen, dass eine Aussortierung von CD25⁺ T-Zellen aus dem Transplantat vor der Transplantation eine GvH-Reaktion verschlechtert. Dagegen zeigte die zusätzliche Infusion von isolierten und expandierten CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen eine Verminderung der Abstoßungsreaktion oder konnte diese sogar verhindern (Taylor, Lees, und Blazar 2002).

Durch eine suffiziente Weiterentwicklung der Methoden und damit verbunden eine Risikominimierung der Therapie, könnte dieser Ansatz in die klinische Therapie Eingang finden (Riley u.a. 2009). Die genaue Charakterisierung menschlicher regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut und in mesenterialen Lymphknoten ist hierzu essentiell (Sakaguchi 2011).

Schon die Unterscheidung regulatorischer T-Zellen in natürlich vorkommende Zellen aus dem Thymus und induzierte Zellen der Peripherie zeigt die Unterschiede innerhalb der Population. Weiter müssen Protokolle zur Isolation, Expansion und Konservierung verfeinert und standardisiert werden (Daniele u. a. 2011).

Generell erscheint Morbus Crohn als uneinheitliche Erkrankung in Hinblick auf den genetischen Hintergrund, den Phänotyp und das Immunsystem des einzelnen Patienten, was die Vorhersage über den Effekt bestimmter Therapien erschwert. Das klinische Bild passt häufig nicht mit dem endoskopischen überein. Die Therapieempfehlung gestaltet sich schwierig, nicht zuletzt aufgrund fehlender standardisierter Definitionen des Schweregrades von Morbus Crohn. Primär gilt der klinische Befund als Therapieparameter, denn die klinische Remission ist nicht unbedingt mit einer Mukosaheilung verbunden.

Die hier vorliegenden Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis dafür, dass die Entwicklung einer Therapie mit regulatorischen T-Zellen Erfolg versprechend scheint.

Ein möglicher Ansatzpunkt hierbei wäre, die CCR4-abhängige Migrationsstörung regulatorischer T-Zellen bei Morbus Crohn günstig zu beeinflussen.

Zusammenfassung

Morbus Crohn ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung. Wechselwirkungen von genetischen Veranlagungen und immunologischen Veränderungen als auch Umweltfaktoren und eine veränderte intestinale Mikrobiota stehen im Zentrum der Ätiopathogenese.

Immunologisch ist nach heutigem Kenntnisstand eine fehlerhafte Balance zwischen Immunantwort und Immuntoleranz gegenüber dem Mikrobiom charakterisierend.

Regulatorische T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Erhaltung des immunologischen Gleichgewichtes. Wenn deren Anzahl reduziert oder deren Funktion im Verhältnis zu den Effektorzellen eingeschränkt ist, resultiert daraus eine gestörte Immunantwort.

Bei Morbus Crohn konnten bisher keine funktionellen Defekte regulatorischer T-Zellen nachgewiesen werden. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass die überschießende Immunantwort am Ort der Entzündung durch eine verminderte Anzahl regulatorischer T-Zellen bedingt ist. Dabei ist ebenso unklar, ob dies aus einer gestörten peripheren Induktion oder gestörten Migration von regulatorischen T-Zellen resultiert.

Regulatorische T-Zellen verfügen über Oberflächenstrukturen, die unter anderem die Wanderung in sekundär lymphatische Organe wie in die Darmlymphknoten und zum Ort der Entzündung ermöglichen. Zwei dieser „Homing-Moleküle“ sind der Chemokinrezeptor CCR4 und das Zell-Adhäsionsmolekül CD62L. Das Chemokin TARC als Ligand für den CCR4-Rezeptor bei funktionellen Untersuchungen wurde ausgewählt, weil es in entzündlichem Gewebe bei Morbus Crohn vermehrt exprimiert wird. CD62L ist vor allem für das Rezirkulieren regulatorischer T-Zellen im Blut und in Lymphknoten wichtig und ist ein Marker für deren supprimierende Aktivität.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Unterschiede in der Expression und Funktionalität von „Homing-Molekülen“ zwischen T-Zell-Populationen von Morbus Crohn-Patienten und gesunden Probanden bestehen. Die Oberflächenstrukturen von T-Zellen wurden mit der Durchflusszytometrie analysiert, wobei Zellen des peripheren Blutes sowie Lymphknotenzellen des Darmes untersucht wurden. Zellen aus unterschiedlichen Geweben sollten eine Aussage über den Aktivitätsstatus und die Rekrutierung regulatorischer T-Zellen liefern.

Weiterhin wurde die spezifische Wanderung regulatorischer T-Zellen anhand eines CCR4-abhängigen Migrationsassays untersucht. In eine Well-Platte wurde dafür eine permeable Membran eingesetzt, durch die die Zellen aktiv wandern konnten. Das Chemokin CCL 17/TARC diente dabei als „Lockstoff“ für die spezifische Migration durch die Membran. Die Anzahl der gewanderten Zellen wurde dann durchflusszytometrisch ermittelt.

Die Vergleichsuntersuchungen ergaben, dass im peripheren Blut die Dichte von CCR4 auf regulatorischen T-Zellen bei Morbus Crohn im Vergleich zu den Gesunden signifikant vermindert ist. Dies stützt die Annahme, dass regulatorische T-Zellen bei Morbus Crohn eine verminderte Expression von Chemokinrezeptoren aufweisen und deshalb nicht zum Ort der Entzündung gelangen können. Die Migration der CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen war bei Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu Gesunden vermindert.

Weiter konnte eine Verminderung des Anteils der CD62L⁺ regulatorischen T-Zellen bei Morbus Crohn-Patienten im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen werden. Auch dies kann als wichtiger Hinweis auf eine fehlerhafte Migration regulatorischer T-Zellen bei Morbus Crohn gewertet werden.

Sowohl im Lymphknoten als auch im peripheren Blut konnten bei den Gesunden als auch bei den an Morbus Crohn Erkrankten deutlich mehr CCR4⁺ regulatorische T-Zellen vom CD45RO⁺-Typ gefunden werden als vom naiven Typ. Die Oberflächeneigenschaften dieser regulatorischen T-Zellen entsprechen dem Phänotyp von Gedächtniszellen, Zellen mit bereits stattgehabtem Antigenkontakt.

Interessanterweise konnten bei den Untersuchungen verschiedene FOXP3-Populationen anhand des Expressionsniveaus für FOXP3 identifiziert werden. Es sind sowohl die FOXP3^{low} Zellen als auch die FOXP3^{high} Zellen bei Morbus Crohn-Patienten im peripheren Blut gegenüber denen bei Gesunden vermindert.

Die vorgestellten Daten zeigen eine reduzierte CCR4-abhängige Migration regulatorischer T-Zellen bei Patienten mit Morbus Crohn. Die aus der verminderten Migration resultierende geringere Anzahl supprimierender T-Zellen im Verhältnis zu den Effektorzellen im Entzündungsgebiet bei Morbus Crohn trägt möglicherweise zu einer chronischen Entzündungsreaktion bei dieser Erkrankung bei.

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-Präsentierende-Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
CTLA-4	engl.: Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4
DIV	Divertikulitis
FITC	Fluorescein
FSC	engl: forward scatter
GITR	engl.: Glucocorticoid-induced Tumor necrosis factor Receptor family-related gene
GK	Gesunde Kontrollgruppe
GvHD	engl.: Graft versus Host Disease
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IFX	Infliximab (TNF α -Antikörper)
IL	Interleukin
MC	Morbus Crohn
MDC	engl.: Macrophage Derived Chemokine
min	Minute
MLN	engl.: Mesenteric Lymph Node (Mesenterialer Lymphknoten)
mM	Millimolar
nm	Nanometer
NOD	engl.: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain
PBA	PBS, BSA, Azid; engl.: phosphate buffered saline
PBMC	engl: Peripheral Blood Mononuclear Cells
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
Rpm	engl.: Rounds per minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium

Abkürzungsverzeichnis

SSC	engl.: side scatter
TARC	engl.:Thymus and activation regulated chemokine
TCR	engl.: T-Cell-Receptor
TGF β	engl.: Transforming Growth Factor beta
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
Treg	regulatorische T-Zelle
U	engl.: Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute

Literaturverzeichnis

Bücher:

Janeway, Charles; Travers, Paul u.a. 2002; Immunologie, 5. Auflage

Alberts, Bruce; Bray, Dennis u.a. 1995; Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage

Zeitschriften:

Abreu, Maria T, Scott Plevy, Bruce E Sands, und Robert Weinstein. 2007. „Selective leukocyte apheresis for the treatment of inflammatory bowel disease“. *Journal of Clinical Gastroenterology* 41 (10) (Dezember): 874–888. doi:10.1097/MCG.0b013e3180479435.

Amsen, Derk, Charalampos G Spilianakis, und Richard A Flavell. 2009. „How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made?“ *Current Opinion in Immunology* 21 (2) (April): 153–160. doi:10.1016/j.coi.2009.03.010.

Apostolaki, Maria, Menelaos Manoloukos, Manolis Roulis, Marc-André Wurbel, Werner Müller, Konstantinos A Papadakis, Dimitris L Kontoyiannis, Bernard Malissen, und George Kollias. 2008. „Role of beta7 integrin and the chemokine/chemokine receptor pair CCL25/CCR9 in modeled TNF-dependent Crohn’s disease“. *Gastroenterology* 134 (7) (Juni): 2025–2035. doi:10.1053/j.gastro.2008.02.085.

Baumgart, Daniel C, und Simon R Carding. 2007. „Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology“. *Lancet* 369 (9573) (Mai 12): 1627–1640. doi:10.1016/S0140-6736(07)60750-8.

Berin, M C, M B Dwinell, L Eckmann, und M F Kagnoff. 2001. „Production of MDC/CCL22 by human intestinal epithelial cells“. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 280 (6) (Juni): G1217–1226.

Best, W R, J M Bectel, J W Singleton, und F Kern. 1976. „Development of a Crohn’s disease activity index. National Cooperative Crohn’s Disease Study“. *Gastroenterology* 70 (3) (März): 439–444.

Best, William R. 2006. „Predicting the Crohn’s disease activity index from the Harvey-Bradshaw Index“. *Inflammatory Bowel Diseases* 12 (4) (April): 304–310. doi:10.1097/01.MIB.0000215091.77492.2a.

Boschetti, Gilles, Stéphane Nancey, Fatima Sardi, Xavier Roblin, Bernard Flourié, und Dominique Kaiserlian. 2011. „Therapy with anti-TNF α antibody enhances number and function of Foxp3(+) regulatory T cells in inflammatory bowel diseases“. *Inflammatory Bowel Diseases* 17 (1) (Januar): 160–170. doi:10.1002/ibd.21308.

Brunkow, M E, E W Jeffery, K A Hjerrild, B Paeper, L B Clark, S A Yasayko, J E Wilkinson, D Galas, S F Ziegler, und F Ramsdell. 2001. „Disruption of a new forkhead/winged-helix protein,

scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse“. *Nature Genetics* 27 (1) (Januar): 68–73. doi:10.1038/83784.

Cuadrado, Emilio. 2009. „Granulocyte/monocyte apheresis as immunotherapeutic tool: cellular adsorption and immune modulation“. *Autoimmunity Reviews* 8 (4) (Februar): 292–296. doi:10.1016/j.autrev.2008.09.001.

Daniele, Nicola, Maria Cristina Scerpa, Fabiola Landi, Maurizio Caniglia, Massimino Jan Miele, Franco Locatelli, Giancarlo Isacchi, und Francesco Zinno. 2011. „T(reg) cells: collection, processing, storage and clinical use“. *Pathology, Research and Practice* 207 (4) (April 15): 209–215. doi:10.1016/j.prp.2011.02.003.

Eckmann, Lars, und Michael Karin. 2005. „NOD2 and Crohn’s Disease: Loss or Gain of Function?“ *Immunity* 22 (6) (Juni): 661–667. doi:10.1016/j.immuni.2005.06.004.

Epple, Hans-Jörg, Christoph Loddenkemper, Desirée Kunkel, Hanno Tröger, Jochen Maul, Verena Moos, Erika Berg, u. a. 2006. „Mucosal but not peripheral FOXP3+ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART“. *Blood* 108 (9) (November 1): 3072–3078. doi:10.1182/blood-2006-04-016923.

Farkas, Stefan, Matthias Hornung, Christine Sattler, Karoline Edtinger, Markus Steinbauer, Matthias Anthuber, Hans J Schlitt, Hans Herfarth, und Edward K Geissler. 2006. „Blocking MAdCAM-1 in vivo reduces leukocyte extravasation and reverses chronic inflammation in experimental colitis“. *International Journal of Colorectal Disease* 21 (1) (Januar): 71–78. doi:10.1007/s00384-004-0709-y.

Franke, Andre, Dermot P B McGovern, Jeffrey C Barrett, Kai Wang, Graham L Radford-Smith, Tariq Ahmad, Charlie W Lees, u. a. 2010. „Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn’s disease susceptibility loci“. *Nature Genetics* 42 (12) (Dezember): 1118–1125. doi:10.1038/ng.717.

Fu, Shuang, Adam C Yopp, Xia Mao, Dongmei Chen, Nan Zhang, Dan Chen, Minwei Mao, Yaozhong Ding, und Jonathan S Bromberg. 2004. „CD4+ CD25+ CD62+ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential“. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4 (1) (Januar): 65–78.

García de Tena, Jaime, Luis Manzano, Juan Carlos Leal, Esther San Antonio, Verónica Sualdea, und Melchor Alvarez-Mon. 2006. „Distinctive pattern of cytokine production and adhesion molecule expression in peripheral blood memory CD4+ T cells from patients with active Crohn’s disease“. *Journal of Clinical Immunology* 26 (3) (Mai): 233–242. doi:10.1007/s10875-006-9016-4.

Grindebacke, Hanna, Hanna Stenstad, Marianne Quiding-Järbrink, Jesper Waldenström, Ingegerd Adlerberth, Agnes E Wold, und Anna Rudin. 2009. „Dynamic development of homing receptor expression and memory cell differentiation of infant CD4+CD25high regulatory T cells“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (7) (Oktober 1): 4360–4370. doi:10.4049/jimmunol.0901091.

Harvey, R F, und J M Bradshaw. 1980. „A simple index of Crohn’s-disease activity“. *Lancet* 1 (8167) (März 8): 514.

Hering, Nina A, und Jörg-Dieter Schulzke. 2009. „Therapeutic options to modulate barrier defects in inflammatory bowel disease“. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 27 (4): 450–454. doi:10.1159/000233283.

Hoffmann, J C, und M Zeitz. 2002. „[Standard therapy of Crohn disease. Consensus-based recommendations]“. *Der Internist* 43 (11) (November): 1376, 1379–1385.

Hoffmann, Petra, Ruediger Eder, Tina J Boeld, Kristina Doser, Biserka Piseshka, Reinhard Andreesen, und Matthias Edinger. 2006. „Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion“. *Blood* 108 (13) (Dezember 15): 4260–4267. doi:10.1182/blood-2006-06-027409.

Hovhannisyan, Zaruhi, Jacquelyn Treatman, Dan R Littman, und Lloyd Mayer. 2011. „Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases“. *Gastroenterology* 140 (3) (März): 957–965. doi:10.1053/j.gastro.2010.12.002.

Iellem, A, M Mariani, R Lang, H Recalde, P Panina-Bordignon, F Sinigaglia, und D D’Ambrosio. 2001. „Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells“. *The Journal of Experimental Medicine* 194 (6) (September 17): 847–853.

Ivanov, Ivaylo I, Brent S McKenzie, Liang Zhou, Carlos E Tadokoro, Alice Lepelley, Juan J Lafaille, Daniel J Cua, und Dan R Littman. 2006. „The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells“. *Cell* 126 (6) (September 22): 1121–1133. doi:10.1016/j.cell.2006.07.035.

Kamiya, Toru, Takafumi Ando, Kazuhiro Ishiguro, Osamu Maeda, Osamu Watanabe, Satoshi Hibi, Shunya Mimura, u. a. 2012. „Intestinal cancers occurring in patients with Crohn’s disease“. *Journal of gastroenterology and hepatology* 27 Suppl 3 (April): 103–107. doi:10.1111/j.1440-1746.2012.07082.x.

Karlinger, K, T Györke, E Makö, A Mester, und Z Tarján. 2000. „The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease“. *European Journal of Radiology* 35 (3) (September): 154–167.

Lee, Jee H, Seung G Kang, und Chang H Kim. 2007. „FoxP3+ T cells undergo conventional first switch to lymphoid tissue homing receptors in thymus but accelerated second switch to nonlymphoid tissue homing receptors in secondary lymphoid tissues“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (1) (Januar 1): 301–311.

Maul, Jochen, Christoph Loddenkemper, Pamela Mundt, Erika Berg, Thomas Giese, Andreas Stallmach, Martin Zeitz, und Rainer Duchmann. 2005. „Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease“. *Gastroenterology* 128 (7) (Juni): 1868–1878.

- Maul, Jochen, und Martin Zeitz. 2011. „Ulcerative colitis: immune function, tissue fibrosis and current therapeutic considerations“. *Langenbeck's Archives of Surgery / Deutsche Gesellschaft Fur Chirurgie* (April 9). doi:10.1007/s00423-011-0789-4.
- Michetti, Pierre, Pascal Juillerat, Christian Mottet, Valérie Pittet, Jean-Jacques Gonvers, John-Paul Vader, Florian Froehlich, und Christian Felley. 2007. „Mild-to-moderate active luminal Crohn's disease“. *Digestion* 76 (2): 92–98. doi:10.1159/000111022.
- Miossec, Pierre, Thomas Korn, und Vijay K Kuchroo. 2009. „Interleukin-17 and type 17 helper T cells“. *The New England Journal of Medicine* 361 (9) (August 27): 888–898. doi:10.1056/NEJMra0707449.
- Mitoma, Hiroki, Takahiko Horiuchi, Nobuaki Hatta, Hiroshi Tsukamoto, Shin-Ichi Harashima, Yuji Kikuchi, Junji Otsuka, Seiichi Okamura, Shigeru Fujita, und Mine Harada. 2005. „Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF-alpha“. *Gastroenterology* 128 (2) (Februar): 376–392.
- Miyara, Makoto, Yumiko Yoshioka, Akihiko Kitoh, Tomoko Shima, Kajsa Wing, Akira Niwa, Christophe Parizot, u. a. 2009. „Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4(+) T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor“. *Immunity* (Mai 20). doi:10.1016/j.immuni.2009.03.019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19464196>.
- Nagase, Kazuko, Ken Fukunaga, Shinichiro Kashiwamura, Tomoaki Kono, Koji Kamikozuru, Yoko Yokoyama, Nobuyuki Hida, u. a. 2011. „Immunoregulatory effects of adsorptive granulocyte and monocyte apheresis in patients with drug refractory Crohn's disease“. *Therapeutic Apheresis and Dialysis: Official Peer-Reviewed Journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy* 15 (4) (August): 367–373. doi:10.1111/j.1744-9987.2011.00970.x.
- Nikolaus, Susanna, und Stefan Schreiber. 2007. „Diagnostics of inflammatory bowel disease“. *Gastroenterology* 133 (5) (November): 1670–1689. doi:10.1053/j.gastro.2007.09.001.
- Ogura, Y, D K Bonen, N Inohara, D L Nicolae, F F Chen, R Ramos, H Britton, u. a. 2001. „A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease“. *Nature* 411 (6837) (Mai 31): 603–606. doi:10.1038/35079114.
- Ohkura, Naganari, und Shimon Sakaguchi. 2010. „Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function“. *Seminars in immunopathology* 32 (2) (Juni): 95–106. doi:10.1007/s00281-010-0200-5.
- Pfoertner, Susanne, Andreas Jeron, Michael Probst-Kepper, Carlos A Guzman, Wiebke Hansen, Astrid M Westendorf, Tanja Toepfer, u. a. 2006. „Signatures of human regulatory T cells: an encounter with old friends and new players“. *Genome Biology* 7 (7): R54. doi:10.1186/gb-2006-7-7-r54.
- Podolsky, Daniel K. 2002. „Inflammatory bowel disease“. *The New England Journal of Medicine* 347 (6) (August 8): 417–429. doi:10.1056/NEJMra020831.

- Ricciardelli, Ida, Keith J Lindley, Marco Londei, und Sonia Quaratino. 2008. „Anti tumour necrosis-alpha therapy increases the number of FOXP3 regulatory T cells in children affected by Crohn’s disease“. *Immunology* 125 (2) (Oktober): 178–183. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02839.x.
- Rieger, Kathrin, Christoph Loddenkemper, Jochem Maul, Thomas Fietz, Daniel Wolff, Harald Terpe, Beate Steiner, u. a. 2006. „Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD“. *Blood* 107 (4) (Februar 15): 1717–1723. doi:10.1182/blood-2005-06-2529.
- Riley, James L., Carl H. June, und Bruce R. Blazar. 2009. „Human T Regulatory Cells as Therapeutic Agents: Take a Billion or So of These and Call Me in the Morning“. *Immunity* 30 (5) (Mai): 656–665. doi:10.1016/j.immuni.2009.04.006.
- Ringheanu, Mihaela, Fredric Daum, James Markowitz, Jeremiah Levine, Seymour Katz, Xingyu Lin, und Jack Silver. 2004. „Effects of infliximab on apoptosis and reverse signaling of monocytes from healthy individuals and patients with Crohn’s disease“. *Inflammatory Bowel Diseases* 10 (6) (November): 801–810.
- Riphaus, A, T Wehrmann, B Weber, J Arnold, U Beilenhoff, H Bitter, S von Delius, u. a. 2008. „[S3-guidelines--sedation in gastrointestinal endoscopy]“. *Zeitschrift Für Gastroenterologie* 46 (11) (November): 1298–1330. doi:10.1055/s-2008-1027850.
- Rothfuss, Katja S, Eduard F Stange, und Klaus R Herrlinger. 2006. „Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases“. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 12 (30) (August 14): 4819–4831.
- Sakaguchi, Shimon. 2011. „Regulatory T cells: history and perspective“. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 707: 3–17. doi:10.1007/978-1-61737-979-6_1.
- Saniabadi, Abbi R, Hiroyuki Hanai, Ken Fukunaga, Koji Sawada, Chikako Shima, Ingvar Bjarnason, und Robert Lofberg. 2007. „Therapeutic leukocytapheresis for inflammatory bowel disease“. *Transfusion and Apheresis Science: Official Journal of the World Apheresis Association: Official Journal of the European Society for Haemapheresis* 37 (2) (Oktober): 191–200. doi:10.1016/j.transci.2007.08.003.
- Saruta, Masayuki, Qi T Yu, Phillip R Fleshner, Pierre-Yves Mantel, Carsten B Schmidt-Weber, Alison H Banham, und Konstantinos A Papadakis. 2007. „Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn’s disease“. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 125 (3) (Dezember): 281–290. doi:10.1016/j.clim.2007.08.003.
- Scaldaferri, Franco, und Claudio Fiocchi. 2007. „Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis“. *Journal of Digestive Diseases* 8 (4) (November): 171–178. doi:10.1111/j.1751-2980.2007.00310.x.
- Silverberg, Mark S, Jack Satsangi, Tariq Ahmad, Ian Dr Arnott, Charles N Bernstein, Steven R Brant, Renzo Caprilli, u. a. 2005. „Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal

World Congress of Gastroenterology“. *Canadian Journal of Gastroenterology* 19 Suppl A (September): 5–36.

Taylor, Patricia A, Christopher J Lees, und Bruce R Blazar. 2002. „The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality“. *Blood* 99 (10) (Mai 15): 3493–3499.

Tchilian, Elma Z, und Peter C L Beverley. 2002. „CD45 in memory and disease“. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* 50 (2): 85–93.

Thomas, Saskia, und Daniel C Baumgart. 2012. „Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis“. *Inflammopharmacology* 20 (1) (Februar): 1–18. doi:10.1007/s10787-011-0104-6.

Wang, Caihong, Elyse K Hanly, Leroy W Wheeler, Manreet Kaur, Keely G McDonald, und Rodney D Newberry. 2010. „Effect of $\alpha\beta 7$ blockade on intestinal lymphocyte subsets and lymphoid tissue development“. *Inflammatory bowel diseases* 16 (10) (Oktober): 1751–1762. doi:10.1002/ibd.21266.

Wittig, B M, und M Zeitz. 2001. „Cytokine and anti-cytokine therapy in chronic inflammatory bowel diseases“. *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)* 126 Suppl 1 (Juni 1): S52–58.

Wong, Maida, David Ziring, Yael Korin, Sheetal Desai, Sungjin Kim, Jan Lin, David Gjertson, Jonathan Braun, Elaine Reed, und Ram Raj Singh. 2008. „TNFalpha blockade in human diseases: mechanisms and future directions“. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 126 (2) (Februar): 121–136. doi:10.1016/j.clim.2007.08.013.

Yuan, Qian, Shannon K Bromley, Terry K Means, Krister J Jones, Fumitaka Hayashi, Atul K Bhan, und Andrew D Luster. 2007. „CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease“. *The Journal of Experimental Medicine* 204 (6) (Juni 11): 1327–1334. doi:10.1084/jem.20062076.

Danksagung

Ich danke Dr. J. Maul für seine fachkundige Betreuung bei inhaltlichen und organisatorischen Fragen und für die Hilfe bei der Präsentation und Publikation der Ergebnisse. Insbesondere gilt mein Dank auch meinem Doktorvater Prof. M. Zeitz für die Bereitstellung des Themas.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und meinen Freunden für die tägliche Unterstützung. Außerdem danke ich meinem Vater für die vielen hilfreichen Gedanken und Verbesserungsvorschläge.

Den Mitarbeitern des Labors, besonders Frau K. Flöckner und Frau S. Wiechmann danke ich für die gute Zusammenarbeit und für die angenehmen gemeinsamen Pausen und persönlichen Motivationsschübe.

Genauso möchte ich meinen Dank dem Nachbarlabor mit den medizinisch technischen Assistenten Frau S. Münchow, Frau U. Dethlefs und Frau Y. Dell aussprechen, die mir oft mit Rat und Tat beiseite standen, mich mit Zellen versorgt oder bei fehlenden Materialien ausgeholfen haben. Auch Herr Dr. A. Hostmann und Herr Dr. R. Ullrich sei für die gute Kooperationsarbeit gedankt.

Lebenslauf

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

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Adriane Julia Reichhardt, versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „CCR4-abhängige Migration regulatorischer T-Zellen bei Morbus Crohn“ selbständig verfasst und ohne unerlaubte Hilfe Dritter angefertigt habe.

Es wurden keine anderen als die im Text angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und auch in Teilen wurden keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt. Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad.

Mir ist die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung bekannt.

Berlin, den 01.07.2012

Adriane Julia Reichhardt