

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar – Direktor: Prof. Dr. Roland M. Schmid

Die Rolle des Chemokins CCL17 in der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen

Lisa Maria Jandl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: Prof. Dr. Anne Krug

Prof. Dr. Roland M. Schmid

Die Dissertation wurde am 21.06.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.04.2019 angenommen.

meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	III
1 Einleitung	1
1.1 Einführung in das Thema	1
1.2 Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED) .	2
1.2.1 Genetik	2
1.2.2 Umweltfaktoren.....	4
1.2.3 Mikrobiom	6
1.2.4 Immunreaktion	9
1.3 Das Chemokin (C-C motif) Ligand 17 (CCL17)	18
1.3.1 Eigenschaften	18
1.3.2 Rolle in verschiedenen Krankheitsgeschehen.....	18
1.3.3 CCL17 in der Pathogenese intestinaler Entzündungen.....	19
1.4 Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit	22
2 Patienten, Material und Methoden	23
2.1 Patienten	23
2.1.1 Patientenkollektiv.....	23
2.1.2 Probengewinnung.....	25
2.2 Material.....	28
2.2.1 Reagenzien, Enzyme und Lösungen.....	28
2.2.2 Primer	29
2.2.3 Antikörper und Protein-Standards	30
2.2.4 Puffer und Medien	31
2.3 Methoden	33
2.3.1 Molekularbiologische Methoden	33
2.3.2 Durchflusszytometrie / fluorescence-activated cell sorting (FACS)	37
2.3.3 Zellisolation und Zellkultur	40
2.3.4 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	42
2.3.5 Statistische Auswertung	43

3	Ergebnisse	45
3.1	Expression von Chemokinen und Zytokinen in der Mukosa von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.....	45
3.2	CCL17-Serumspiegel von Patienten mit CED	52
3.3	Identifizierung der CCL17-exprimierenden Zellpopulationen im menschlichen Darm	53
3.3.1	Etablierung eines Protokolls zum Nachweis von intrazellulärem CCL17 mittels Durchflusszytometrie.....	53
3.3.2	Expression von CCL17 in einzelnen Populationen mukosaler Leukozyten	58
3.4	Wirkung von CCL17 auf dendritische Zellen.....	60
4	Diskussion.....	64
4.1	Übersicht über die experimentellen Befunde	64
4.2	Methodendiskussion.....	65
4.2.1	Auswahl von Patienten und Gewebe.....	65
4.2.2	Nachweismethoden von CCL17	68
4.2.3	Wirkung von CCL17 <i>in vitro</i>	69
4.3	Eigene Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur.....	70
4.3.1	Expression von CCL17 bei Patienten mit CED.....	70
4.3.2	CCL17-produzierende Zellpopulationen	73
4.3.3	Wirkungsweisen von CCL17.....	75
4.4	Beurteilung der Ergebnisse	75
4.4.1	Rolle von CCL17 bei der CED Entstehung.....	75
4.4.2	Klinische Relevanz	78
5	Zusammenfassung	80
6	Literaturverzeichnis	82
	Danksagung	101
	Lebenslauf.....	102

Verzeichnis der Abkürzungen

α	alpha
β	beta
γ	gamma
Δ	delta
κ	kappa
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
6-MP	6-Mercaptopurin
Abb.	Abbildung
AD	Atopische Dermatitis
AF	Alexa Fluor
AIEC	adhärent-invasiver E.coli
AMP	antimikrobielle Peptide
AP-1	<i>activating protein-1</i>
APC	antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin (Diese Bedeutung wird nur in 2.2 Material verwendet)
BSA	bovines Serumalbumin
BV	Brilliant Violet
bzw.	beziehungsweise
CCL	(CC-motif) Ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
Ct	<i>cycle threshold</i>

CU	Colitis ulcerosa
Cy	<i>cyanine dye</i>
DC	<i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxynukleosid-5´triphosphat
DSS	Dextran-Natrium-Sulfat
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiotreitol
E	Amplifikations-Effizienz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
engl.	Englisch
et al.	und andere
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FC-Block	Fc-Rezeptor-blockierendes Reagens
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	<i>forkhead box protein 3</i>
FS	<i>first-strand</i>
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung (als Einheit im Zusammenhang mit Zentrifugation)
g	Gramm
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GWAS	<i>genome wide association study</i> , genomweite Assoziationsstudie
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure

HLA-DR	<i>human leukocyte antigen – antigen D related</i>
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HRP	<i>horse-radish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
k.A.	keine Angabe
Lin	<i>lineage cocktail</i>
Log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
LZ	Langerhans-Zelle
m	männlich
M	Molar
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MC	Morbus Crohn
MDC	<i>macrophage derived chemokine</i>
MFI	mediane Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
Mono-DC	von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
n	<i>number</i> , Anzahl
N	Normal
n.d.	nicht detektierbar
NEAA	<i>non-essential amino acids</i> , nicht-essentielle Aminosäuren
NF- κ B	<i>nuclear factor-κB</i>
ng	Nanogramm
NK-Zelle	natürliche Killerzelle

NKT-Zelle	natürliche Killer-T-Zelle
nm	Nanometer
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein</i>
OP	Operation
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCp	Peridinin-Chlorophyll
pg	Pikogramm
PI	Propidiumiodid
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
r	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
ROR γ t	<i>retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gamma t</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> -Medium
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
sec	Sekunde(n)
SSC	<i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
T-bet	<i>T-box transcription factor</i>
Tab.	Tabelle
TARC	<i>thymus and regulation activated chemokine</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Treg	regulatorische T-Zelle
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>

v/v	Volumen pro Volumen
w	weiblich
w/v	Masse pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Einführung in das Thema

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind nach wie vor weltweit auf dem Vormarsch. Die beiden Hauptentitäten dieser Gruppe von Erkrankungen, Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU), wurden bereits 1623 (Baumgart 2008) bzw. 1859 (Banerjee 1991) erstmals beschrieben. Doch erst im Zuge der Industrialisierung wurde eine starke Zunahme der Inzidenz in den westlichen Nationen verzeichnet. Noch immer weisen Europa, Nordamerika und Australien die höchsten Erkrankungsraten auf. Während sich hier die Inzidenz und Prävalenz auf ein stabiles Niveau einzupendeln scheint, steigen nun die Fallzahlen besonders in Schwellenländern wie China, Südkorea oder Indien (Bernstein and Shanahan 2008, Cosnes, Gower-Rousseau et al. 2011, Molodecky, Soon et al. 2012, Ng, Bernstein et al. 2013).

Die letzte große Errungenschaft in der CED Therapie war die Einführung der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α -Inhibitoren vor rund 15 Jahren (Hanauer, Feagan et al. 2002, Rutgeerts, Sandborn et al. 2005, Colombel, Sandborn et al. 2007, Sandborn, van Assche et al. 2012). Doch Resistenzentwicklung und teils schwere Nebenwirkungen limitieren deren Erfolg (Peyrin-Biroulet and Lemann 2011). Neue Wirkstoffe zur zielgerichteten Therapie werden bereits bei Patienten mit Unverträglichkeit oder ungenügendem Ansprechen auf die konventionelle Therapie eingesetzt oder befinden sich in klinischer Erprobung. Januskinase-Inhibitoren, Antikörper gegen Interleukin (IL)-12/23 und Anti-Adhäsionsmoleküle sind vielversprechende Beispiele (Perez, Martin et al. 2017).

Dennoch besteht weiterhin großer Bedarf an neuen Therapiemöglichkeiten, um den Krankheitsverlauf und die Lebensqualität von Menschen mit CED zu verbessern.

1.2 Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED)

Trotz weitreichender epidemiologischer und grundlagenorientierter Studien auf dem Gebiet der CED ist deren kausale Pathogenese bis heute nicht ausreichend geklärt. Vielmehr gibt es zahlreiche Hinweise auf einzelne Faktoren, die zum Krankheitsgeschehen beitragen. Allein 242 Allele sind bereits bekannt, die in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) mit einer gesteigerten Empfänglichkeit für MC und/oder CU in Verbindung gebracht wurden (Mirkov, Verstockt et al. 2017). Somit erklären sich auch familiäre Belastung und ethnische Zugehörigkeit als Risikofaktoren. Darüber hinaus scheinen Lebensstil und Umweltfaktoren eine wichtige Rolle zu spielen. Migrationsstudien zeigen, dass sich das Erkrankungsrisiko mit den Lebensumständen ändert (Lamba, Tharayil et al. 2017). Dafür verantwortlich gemacht werden vielfältige Einflüsse, wie Ernährung, Hygienestandards, Antibiotikagebrauch, Exposition gegenüber Mikroorganismen, Luftverschmutzung, sozioökonomische und psychische Faktoren, Tabakkonsum und viele andere. Weiterhin scheint die Zusammensetzung der mikrobiellen Darmflora ein entscheidender Faktor in der Krankheitsentstehung zu sein.

Somit erweist sich die CED Entstehung als hochkomplexes, multifaktorielles Geschehen. Einig sind sich Forscher aktuell über folgendes Modell der Pathogenese der CED: Wird ein genetisch prädisponiertes Individuum mit ungünstigen Umwelt- und Lebensstileinflüssen konfrontiert, kommt es zu einer fehlregulierten Immunreaktion gegen kommensale Mikroorganismen des Darms.

1.2.1 Genetik

Dass Genetik eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer CED spielt, gilt schon lange als gesichert. Bereits Anfang des 20sten Jahrhunderts wurde eine familiäre Häufung bei Patienten mit CED beobachtet und seither vielfach bestätigt (Allchin 1909, Ek, D'Amato et al. 2014). Bis zu 23 % der an MC oder CU erkrankten Patienten haben mindestens einen erstgradigen Verwandten, der ebenfalls an einer CED leidet. Eine positive Familienanamnese ist der größte unabhängige Risikofaktor für das Auftreten einer CED (Ek, D'Amato et al. 2014). Studien mit Zwillingen ergaben deutlich höhere Konkordanzraten für die Entwicklung einer CED bei eineiigen gegenüber zweieiigen Geschwistern (Brant 2011), was den Einfluss genetischer Faktoren weiter unterstreicht. Die Tatsache, dass die

Erkrankungswahrscheinlichkeit eines genetisch identischen Zwillings für MC bei 39 - 64 % und für CU bei nur 7 - 28 % liegt (Ek, D'Amato et al. 2014), zeigt jedoch auch, dass es sich hierbei nicht um reine Erbkrankheiten handelt.

Ein großer Durchbruch in der Erforschung der genetischen Grundlagen bei CED gelang 2001: Zwei unabhängige Gruppen identifizierten das nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (*NOD2*) Gen als ersten Suszeptibilitäts-Genort für MC (Hugot, Chamaillard et al. 2001, Ogura, Bonen et al. 2001). Hugot et al. fanden eine Assoziation mit MC für drei unterschiedliche Polymorphismen in diesem Gen. *NOD2* kodiert für den gleichnamigen intrazellulären PRR (engl. pattern recognition receptor). PRR sind Rezeptoren, die Molekularstrukturen von Mikroorganismen erkennen, und stellen so ein bedeutendes Element der angeborenen Immunabwehr dar. *NOD2* wird von vielen Zellen der intestinalen Mukosa exprimiert und erkennt Muramyldipeptid, das sich von Peptidoglycanen sowohl von gram-positiven als auch gram-negativen Bakterien ableitet. Es aktiviert nuclear factor- κ B (NF- κ B)- und mitogen-activated protein kinase (MAPK)-Signalwege, die zur Produktion inflammatorischer Zytokine und antimikrobieller Peptide (AMP) sowie verstärkter Mukusbildung führen. Da *NOD2* sowohl auf kommensale als auch auf pathogene Mikroorganismen reagiert, wird davon ausgegangen, dass es eine Schlüsselrolle in der Abwehr von Krankheitserregern und gleichermaßen in der Aufrechterhaltung der Homöostase der mikrobiellen Darmflora einnimmt (Al Nabhani, Dietrich et al. 2017).

Die Entdeckung der Assoziation von Polymorphismen im *NOD2* Gen mit MC war weit mehr als nur die Bestätigung der erblichen Komponente bei der Krankheitsentstehung. Es war der Beginn einer neuen Herangehensweise bei der Erforschung der Pathomechanismen von CED. Die Identifizierung der Proteine, die von mit CED assoziierten Genen kodiert werden, erlaubt Rückschlüsse auf Signalwege, Mediatoren oder Zelltypen, die bei der Pathogenese eine Rolle spielen, und bietet somit Ausgangspunkte für die weitere Untersuchung der Mechanismen, die zum Krankheitsgeschehen führen. Aus dem besseren Verständnis der Pathophysiologie wiederum ergeben sich neue Ansatzpunkte für therapeutische Interventionen.

Die Etablierung der GWAS in der letzten Dekade ermöglichte die Identifizierung von bislang 242 Genorten, die mit MC und/oder CU in Verbindung gebracht werden

(Mirkov, Verstockt et al. 2017). Nicht alle diese Loci befinden sich in kodierenden Regionen, doch es wurden zahlreiche Proteine identifiziert, denen entweder bereits zuvor oder dank ihrer Entdeckung mittels GWAS eine wichtige Funktion in der Pathophysiologie der CED Entstehung zugeschrieben werden konnte. Die CED-assoziierten Gene sind beispielsweise in Mechanismen wie Autophagie, T-Zell-Differenzierung, mukosale Barrierefunktion oder TNF- α -Signalwege involviert, welche als Schlüsselmechanismen in der CED Pathogenese gelten (Ek, D'Amato et al. 2014, McGovern, Kugathasan et al. 2015).

Doch auch die große Zahl der entdeckten CED-assoziierten Gene erklärt weniger als 50 % der epidemiologisch beobachteten und in Zwillingsstudien berechneten Erbllichkeit sowohl bei MC als auch bei CU (Gordon, Trier Moller et al. 2015). Dieses als „fehlende Erbllichkeit“ bezeichnete Phänomen ist auch von anderen multifaktoriell bedingten Krankheiten bekannt. Man geht davon aus, dass einige prädisponierende Gene, insbesondere weit verbreitete mit niedriger Penetranz und seltene mit hoher Penetranz, noch nicht entdeckt sind und dass Epigenetik ebenso wie die Kombination bestimmter Allele eine wichtige Rolle spielen.

1.2.2 Umweltfaktoren

Das vermehrte Auftreten von CED im Zusammenhang mit Industrialisierung, Modernisierung des Lebensstils und zunehmendem Wohlstand weist unumstößlich auf den Zusammenhang der Krankheitsentstehung mit den Umwelt- und Lebensbedingungen hin. Da sich im Zuge dieser Veränderungen zahlreiche Einzelfaktoren gleichzeitig ändern, ist es nicht einfach zu bestimmen, welche Elemente tatsächlich die Entwicklung einer CED begünstigen und welche nur eine zufällige Koinzidenz darstellen.

Rauchen ist dabei einer der am besten untersuchten Risikofaktoren. Es wurde gezeigt, dass Tabakrauch den Krankheitsverlauf bei MC ungünstig beeinflusst, das Entstehen von Fisteln und Strikturen begünstigt, zu häufigeren Exazerbationen und höherem Kortisonbedarf führt, eine höhere Rate chirurgischer Interventionen nötig macht und häufiger mit extraintestinalen Manifestationen einhergeht (Cosnes 2004, Mahid, Minor et al. 2006, Ott, Taksess et al. 2014). Bei CU hingegen zeigt sich ein protektiver Effekt des Rauchens hinsichtlich Krankheitsentwicklung und Schwere der Erkrankung (Mahid, Minor et al. 2006, Parkes, Whelan et al. 2014). Doch weder die

genauen Mechanismen, die dahinter stecken, noch die ursächlichen Bestandteile des Zigarettenrauchs konnten bislang eindeutig identifiziert werden. Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, dass Zigarettenrauch mit vier wesentlichen Komponenten der CED Entstehung interagiert: Dem Mikrobiom, der intestinalen Epithel-Integrität, dem Immunsystem und epigenetischen Vorgängen (Parkes, Whelan et al. 2014). Den lindernden Einfluss bei CU Patienten erklären könnten unter anderem der immunsuppressive Effekt des Rauchens auf T-Lymphozyten, die verringerte Produktion inflammatorischer Zytokine und Stickoxide sowie eine verstärkte Mukusproduktion (Baumgart and Carding 2007, Ng, Bernstein et al. 2013). Bei rauchenden MC Patienten wird eine veränderte Zytokinantwort, darunter etwa ein reduzierter IL-10/IL-12-Quotient, als möglicher Mechanismus für die ungünstigen Effekte angesehen (Bergeron, Grondin et al. 2012, Parkes, Whelan et al. 2014).

Weiterhin wurde der Einfluss der Ernährung auf das Krankheitsgeschehen bei CED eingehend untersucht. Verschiedene Tiermodelle zeigten einen potentiell entzündungsbegünstigenden Effekt von fettreicher Diät (Gruber, Kisling et al. 2013), rotem Fleisch (Le Leu, Young et al. 2013), Gluten (Wagner, Schmidt et al. 2013), Maltodextrin (Nickerson and McDonald 2012) und Emulgatoren (Chassaing, Koren et al. 2015). Bestimmten Faserstoffen und Sojaproteinen wurden hingegen protektive Eigenschaften zugesprochen (Jiang, Przybyszewski et al. 2011, Hung and Suzuki 2016). In der Tat zeigten auch beim Menschen viele Studien ein höheres CED Erkrankungsrisiko für Individuen mit hohem Konsum an Fleisch und Fett, besonders mehrfach ungesättigten und Omega-6-Fettsäuren, während unter Menschen, die sich faserreich ernährten, das Risiko geringer war (Hou, Abraham et al. 2011, Ananthakrishnan, Khalili et al. 2014).

Auch der Zusammenhang zwischen CED Risiko und Appendektomie ist Gegenstand zahlreicher Studien. Während ein protektiver Effekt der Appendektomie bei CU als weitgehend belegt gilt (Koutroubakis and Vlachonikolis 2000), wurde sie für MC lange Zeit als Risikofaktor angenommen, da Studien ein vermehrtes Auftreten von MC nach Appendektomie zeigten (Koutroubakis and Vlachonikolis 2000). Aktuell wird jedoch diskutiert, ob es sich bei diesem Effekt um ein Bias handelt, welches der nicht seltenen Fehldiagnose eines ileozökalen MC als Appendizitis geschuldet ist (Radford-Smith, Edwards et al. 2002, Maaser, Langholz et al. 2016).

Als weitere Ursache für die Entstehung von CED wurden verbesserte Hygienebedingungen vielfach diskutiert. Einzelne Studien konnten für Lebensumstände wie große Familien mit vielen Kindern, weniger wohlhabende Familien, niedriger Geburtsrang, fehlender Zugang zu Leitungs- oder Warmwasser, Zusammenleben mit vielen Menschen oder Konsum mikrobiell verunreinigter Nahrungsmittel, ein niedrigeres Risiko für die Entwicklung einer CED, insbesondere MC, zeigen (Baumgart and Carding 2007). Maaser et al. bieten jedoch eine Übersicht der diesbezüglichen Literatur, die verdeutlicht, dass aktuell weder eine Annahme noch Verwerfung der Hygiene-Theorie zulässig ist (Maaser, Langholz et al. 2016). Dies waren nur einige Beispiele für Umwelt- und Lebensstileinflüsse, für die ein Zusammenhang mit CED vermutet wird. Als Mechanismus für das Wirken dieser Faktoren wird in den meisten Fällen die Auswirkung auf das intestinale Mikrobiom und die Immunantwort angenommen. Diese Kernpunkte der CED Entstehung werden im Folgenden ausführlich besprochen.

1.2.3 Mikrobiom

Die menschliche Darmflora ist ein komplexes Ökosystem. Über 1000 Bakterienspezies aber auch Pilze, Viren und Archaeen sind an ihrer Bildung beteiligt. Ein Individuum beherbergt in der Regel mindestens 160 verschiedene Bakterien im Darm. Dabei übersteigt die absolute Anzahl dieser Bakterien die Zahl der menschlichen Körperzellen um das Zehnfache (Qin, Li et al. 2010). Im Regelfall profitiert der menschliche Wirt von dieser Symbiose, doch das Zusammenleben mit so vielen Mikroorganismen stellt für das Immunsystem eine große Herausforderung dar. Es muss in der Lage sein, harmlose kommensale Bakterien und Nahrungsantigene von pathogenen Keimen zu unterscheiden und entsprechend mit Toleranz oder Abwehr zu reagieren.

Patienten mit CED weisen gegenüber dem gesunden Kontrollkollektiv eine veränderte Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms auf. Ein gestörtes Zusammenspiel von Wirt und Mikroorganismen des Darms wird als zentrales Ereignis in der Pathogenese von CED betrachtet. Beim Menschen besteht die Darmflora zum Großteil aus vier Bakterienstämmen, den *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* und *Proteobacteria* (Eckburg, Bik et al. 2005, Khanna and Tosh 2014). Bei Patienten mit CED wurde eine Reduktion des Anteils der *Firmicutes*

(Sokol, Seksik et al. 2006, Frank, St Amand et al. 2007) und auch eine geringere Diversität der einzelnen Spezies dieses Stammes beobachtet (Ott, Musfeldt et al. 2004, Manichanh, Rigottier-Gois et al. 2006). Dafür fanden einige Studien einen größeren Anteil an *Bacteroidetes* (Walker, Sanderson et al. 2011, Andoh, Kuzuoka et al. 2012). Darunter wird besonders dem adhären, Biofilm-bildenden *Bacteroides fragilis* eine Bedeutung für die CED Entstehung beigemessen (Swidsinski, Weber et al. 2005).

Die meisten bekannten humanpathogenen Darmkeime gehören den *Proteobacteria* an. Auch diesen vermehrt bei Patienten mit CED auftretenden Bakterien wurde aufgrund ihrer Fähigkeiten zur Adhärenz und Invasion eine Rolle bei der Krankheitsentstehung beigemessen (Mukhopadhyaya, Hansen et al. 2012). Die Beobachtung, dass sich CED häufig im Anschluss an eine Gastroenteritis klinisch bemerkbar machen, gab Anlass zur Untersuchung von *Campylobacter*- und *Salmonella*-Arten. Tatsächlich wurde ein erhöhtes Krankheitsrisiko nach einer Infektion mit diesen Erregern entdeckt (Gradel, Nielsen et al. 2009).

In jüngerer Zeit rückte eine spezielle Gruppe von *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien, die adhären-invasiven *E. coli* (AIEC), in den Fokus der Forschung. Sie wurden als Auslöser der granulomatösen Kolitis bei Boxer-Hunden identifiziert (Simpson, Dogan et al. 2006) und induzierten auch *in vitro* Granulome, die frühen Epitheloidzellgranulomen, wie sie bei MC gefunden werden, ähnelten (Meconi, Vercellone et al. 2007). Passend dazu konnte eine höhere Prävalenz von AIEC in entzündetem Dünndarmgewebe von MC Patienten verglichen mit dem Gewebe einer gesunden Kontroll-Kohorte nachgewiesen werden. Dagegen wurden bei der nicht mit Granulomen einhergehenden CU keine AIEC gefunden (Darfeuille-Michaud, Boudeau et al. 2004).

Es wurde noch eine Vielzahl weiterer Bakterien im Zusammenhang mit CED untersucht. Doch es scheint unwahrscheinlich, dass ein spezieller Keim für die Entstehung einer CED verantwortlich gemacht werden kann. Vielmehr wird vermutet, dass die Gesamtheit der Änderungen im intestinalen Mikrobiom zur Krankheitsentstehung beiträgt (Hold, Smith et al. 2014).

Es drängt sich die Frage auf, ob die beobachteten Veränderungen der Darmflora Ursache oder Wirkung der CED sind. Studien, die auch bei gesunden Verwandten von CED Patienten (Joossens, Huys et al. 2011, Varela, Manichanh et al. 2013) und

nicht erkrankten Trägern von CED-Suzeptibilitäts-Genen, wie z.B. *NOD2*, (Frank, Robertson et al. 2011) eine Dysbiose der intestinalen Mikroflora feststellen konnten, weisen darauf hin, dass die Veränderungen im Mikrobiom vermutlich Folge genetischer sowie umweltbedingter Faktoren und keine alleinige Konsequenz der intestinalen Entzündung sind.

Weiterhin stellt sich die Frage, auf welche Art und Weise sich Veränderungen der Mikroflora auf die intestinale Entzündungsreaktion auswirken. Darmbakterien stehen in Wechselwirkung mit der Epithelzellfunktion, dem Immunsystem und dem Metabolismus des menschlichen Wirtes. Eine Metagenom-Analyse des menschlichen Darm-Mikrobioms zeigte bei Patienten mit CED eine quantitative Reduktion von Genen des Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsels und eine stärkere Ausprägung von Genen, die in Signalwege des oxidativen Stress involviert sind, (Morgan, Tickle et al. 2012) und stützt damit die Hypothese, dass oxidativer Stress der Darmbakterien zur Entzündungsentstehung beiträgt.

Weitere Theorien befassen sich mit spezifischen Metaboliten des bakteriellen Stoffwechsels. Kommensale Bakterien wandeln unverdauliche Faserstoffe um und produzieren kurzkettige Fettsäuren, wie das Butyrat. Dieses stellt eine Energiequelle für Epithelzellen dar und fördert die Produktion von Schleim und AMP (Sokol, Pigneur et al. 2008, Matsuoka and Kanai 2015). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Butyrat den proinflammatorischen NF- κ B-Signalweg inhibiert (Segain, Raingeard de la Bletiere et al. 2000). Bei Mäusen induziert es die Differenzierung regulatorischer T-Zellen im Kolon (Furusawa, Obata et al. 2013). Bei Patienten mit CED wurde sowohl eine verringerte Butyratkonzentration im Stuhl als auch ein vermindertes Vorkommen des Butyrat-produzierenden *Faecalibacterium prausnitzii* gefunden (Sokol, Pigneur et al. 2008, Takaishi, Matsuki et al. 2008).

Doch nicht nur die Art der Bakterien im Darm scheint entscheidend zu sein sondern auch deren Verteilungsmuster insbesondere im Hinblick auf den Kontakt zur Epithelschicht. So wurde bei Patienten mit CED eine wesentlich höhere Konzentration von Bakterien in der das Epithel bedeckenden Schleimschicht gefunden (Schultsz, Van Den Berg et al. 1999, Swidsinski, Ladhoff et al. 2002), was darauf hinweist, dass der direkte Kontakt von Bakterien zur intestinalen Mukosa und zu den Immunzellen des Darms die Krankheitsentstehung fördert.

Zusammengefasst gibt es zahlreiche Hinweise für die zentrale Rolle des intestinalen Mikrobioms beim Zustandekommen einer CED. Es kann angenommen werden, dass die gestörte Interaktion zwischen Darmflora und Immunsystem mit nachfolgender inadäquater Entzündungsreaktion den Kernpunkt der Pathogenese darstellt.

1.2.4 Immunreaktion

Wie auch im übrigen menschlichen Organismus unterscheidet man im Abwehrsystem des Darms die angeborene von der adaptiven Immunantwort. Beide Teile und besonders deren Zusammenspiel sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Homöostase im Darm – der Toleranzentwicklung gegenüber kommensalen Bakterien und der Abwehr pathogener Keime. Im Folgenden werden einige Komponenten der Immunreaktion erläutert, die in Zusammenhang mit der Entstehung von CED gebracht werden.

Mukosale Barrierefunktion und angeborene Abwehr

Das Epithel der Darmschleimhaut hält als „Verteidigung der ersten Reihe“ verschiedene Abwehrmechanismen bereit: Die Epithelzellen sind über „tight junctions“ miteinander verbunden, wodurch die Permeabilität der Epithelschicht streng geregelt wird. Bei Patienten mit MC wurde eine erhöhte parazelluläre Durchlässigkeit bereits vor vielen Jahren entdeckt und sowohl bei MC als auch bei CU konnten strukturelle Anomalien der „tight junctions“ festgestellt werden (Shen, Su et al. 2009).

Darüber hinaus produzieren Becherzellen einen Schleimfilm, der die Mukosaoberfläche vom luminalen Inhalt abschirmt. Besonders bei CU wurden eine Verringerung der Becherzellichte und Schleimschichtdicke sowie bakterielle Durchsetzung des Mukus beobachtet und als Krankheitsursache diskutiert (Schultsz, Van Den Berg et al. 1999, Johansson 2014).

Ein weiterer unspezifischer Abwehrmechanismus ist die Sekretion von AMP durch Paneth-Körnerzellen, während mit der Sekretion von Immunglobulin (Ig) A durch B-Zellen auch das adaptive Immunsystem am Aufbau der mukosalen Barriere beteiligt ist. Es wird davon ausgegangen, dass Defekte der mukosalen Barrierefunktion durch eine gesteigerte Permeabilität des Epithels und vermehrte Translokation bakterieller

Antigene eine gesteigerte Immunantwort gegen luminale Mikroorganismen hervorrufen (Sanchez de Medina, Romero-Calvo et al. 2014).

Zum angeborenen Immunsystem des Darms gehören weiterhin zahlreiche Zellen der Lamina propria, wie Makrophagen, dendritische Zellen (DC), Granulozyten, Mastzellen oder NK-Zellen (engl. natural killer). Viele dieser Zellen, aber auch Zellen nicht-myeloiden Ursprungs, besitzen neben ihrer spezifischen Funktion ein Kernelement der angeborenen Abwehr: die PRR. Dabei handelt es sich um Rezeptoren, die bestimmte, charakteristische Strukturen von Erregern, die sogenannten PAMP (engl. pathogen-associated molecular patterns) erkennen und daraufhin unter anderem zur NF- κ B-vermittelten Freisetzung von TNF- α und anderen entzündlichen Mediatoren führen. Eine wichtige Gruppe von PRR sind die TLR (engl. toll-like receptors).

Im Kontext von CED erscheinen besonders TLR-4, der Rezeptor für Lipopolysaccharid (LPS), und der gram-positive Bakterien erkennende TLR-2 bedeutsam.

CED Patienten zeigen abweichende TLR-Expressionsmuster verglichen mit gesunden Menschen, darunter eine gesteigerte Expression von TLR-4 in intestinalen Epithelzellen (Cario and Podolsky 2000), sowie eine Assoziation mit Polymorphismen in verschiedenen TLR-Genen (Pierik, Joossens et al. 2006, De Jager, Franchimont et al. 2007, Torok, Glas et al. 2009). TLR-4 und TLR-2 sind in Makrophagen im entzündeten Darm überexprimiert (Hausmann, Kiessling et al. 2002) und im Mausmodell konnten TLR-4-Antagonisten den Erkrankungsverlauf mildern (Fort, Mozaffarian et al. 2005). Weiterhin wurde gezeigt, dass die in IL-10-defizienten Mäusen spontan auftretende Kolitis abhängig vom TLR-Signalweg ist (Rakoff-Nahoum, Hao et al. 2006).

Diese Entdeckungen zeigen die wichtige Rolle, die das angeborene Immunsystem bei der CED Entstehung spielt.

Antigenpräsentierende Zellen

Professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) stellen die Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar. Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und DC sind in der Lage, körperfremde und körpereigene Partikel aufzunehmen, zu prozessieren und an ihrer Zelloberfläche zu präsentieren. Diese

Präsentation erfolgt mithilfe des HLA-DR (engl. human leukocyte antigen – antigen D related) Moleküls. Daher kann HLA-DR als Indikator für APC herangezogen werden.

Die am stärksten auf Antigenpräsentation spezialisierten Zellen sind die DC. Sie schaffen nicht nur die Voraussetzung für eine antigenspezifische Abwehr durch die adaptive Immunreaktion, sondern lenken auch mithilfe von Mediatoren die Art der folgenden Immunantwort. Somit sind sie maßgeblich an der Entscheidung beteiligt, ob auf ein Antigen mit Abwehr oder Toleranz reagiert wird.

DC kommen in nahezu allen lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben vor, sind jedoch besonders häufig in den Grenzschichten, wie Darm, Lunge und Haut, anzutreffen. Sie werden in konventionelle DC und plasmazytoide DC eingeteilt (Segura and Villadangos 2009) und stammen von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab. Sie sind im Darm in der gesamten Lamina propria, den Peyer-Plaques und den mesenterialen Lymphknoten zu finden. Dort werden sie durch die residenten Makrophagen ergänzt, die gegenüber mikrobieller Stimulation refraktär sind und eine immunsupprimierende, die Immunhomöostase aufrechterhaltende Wirkung haben. Diese werden stetig durch aus dem Blut eingewanderte Monozyten erneuert (Bain, Scott et al. 2013). Im entzündeten Darm jedoch kommt es zu einer massiven Infiltration von Monozyten in die Mukosa und zur Differenzierung in proinflammatorische Zellen, die Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-23 und TNF- α produzieren, was wiederum die Aktivierung der DC und die Differenzierung der T-Zellen in proinflammatorische Effektorzellen verstärkt (Zigmond, Varol et al. 2012).

Mittlerweile weiß man, dass DC eine heterogene Gruppe sind und aus vielen Subpopulationen bestehen. Während bei Mäusen diese Untergruppen gut charakterisiert sind, stellt die Identifikation von DC im menschlichen Darm noch immer eine Herausforderung dar, da kein einheitlicher Oberflächenmarker, den alle DC teilen, bekannt ist. So findet sich das im murinen System als typischer DC-Marker verwendete CD (engl. cluster of differentiation) 11c beim Menschen auch auf der Oberfläche von Makrophagen (Hashimoto, Miller et al. 2011). Daher verwenden viele Arbeitsgruppen für die Charakterisierung intestinaler DC beim Menschen eine Strategie, die unter den HLA-DR⁺ Zellen jene Zellen ausschließt, die eindeutig einer anderen Zellpopulation zugeordnet werden können. So definieren beispielsweise Bernardo et al. DC als HLA-DR⁺CD3⁻CD14⁻CD16⁻CD19⁻CD34⁻ (Bernardo 2013). Tamoutounour et al. schlagen CD64 als Unterscheidungsmerkmal zwischen DC und

Makrophagen vor (Tamoutounour, Henri et al. 2012). Doch obwohl immer mehr über die Definition einzelner Subpopulationen bekannt wird (Persson, Scott et al. 2013), existiert noch immer keine einheitliche Identifikationsstrategie für DC im humanen System.

Einigkeit herrscht hingegen darüber, dass intestinale DC essentiell wichtig für die Entwicklung der Toleranz gegenüber Mikroorganismen der physiologischen Darmflora sind und somit auch in der CED Pathogenese eine wichtige Funktion einnehmen. Unreife DC inkorporieren permanent Antigene aus ihrer Umgebung. Durch Makropinozytose nehmen sie große Mengen an Flüssigkeit mit allen darin gelösten Antigenen auf. Die Phagozytose erlaubt die Internalisierung von Bakterien, Viren und Zellfragmenten. In spezifischer Weise geschieht dies auch bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose (Sallusto, Cella et al. 1995, Albert, Pearce et al. 1998). Nach der Aufnahme werden Antigene in Peptidfragmente aufgespalten und an HLA-DR gebunden an der Zelloberfläche den CD4⁺ T-Zellen präsentiert. In Abwesenheit pathogener Keime wandern DC permanent über die Lymphabflusswege in die mesenterialen Lymphknoten aus und vermitteln dort Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen und solchen von harmlosen kommensalen Mikroorganismen (Rutella and Locatelli 2011). Erkennen DC ein Pathogen, entwickeln sie einen reifen Phänotyp und leiten eine Immunantwort ein. Neben der Hochregulierung von HLA-DR zur effektiven Präsentation des schädlichen Antigens werden weitere kostimulatorische Oberflächenmoleküle exprimiert und Zytokine sezerniert, welche die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen beeinflussen. So weisen aktivierte DC beispielsweise eine höhere Expression von CD80 und CD86 auf, welches an CD28 von naiven T-Zellen bindet und zu deren Aktivierung beiträgt (Lenschow, Walunas et al. 1996). Weiterhin bestimmt das Zytokinmilieu, in welche Richtung sich die T-Zelle differenziert. In Anwesenheit von IL-12 entwickeln sich die naiven T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) zu Th1-Zellen (Hsieh, Macatonia et al. 1993), IL-4 führt zur Differenzierung in Th2-Zellen (Swain, Weinberg et al. 1990) und die Kombination von IL-6, IL-23 und TGF- β (engl. transforming growth factor beta) vermittelt die Entstehung von Th17-Zellen, die durch IL-1 β noch verstärkt wird (Bettelli, Carrier et al. 2006). Diesen drei Arten von Th-Zellen wird ein proinflammatorischer Einfluss zugesprochen. Regulatorische T-Zellen (Treg)

hingegen entstehen in Anwesenheit von TGF- β und Retinolsäure (Sun, Hall et al. 2007, Liu, Zhang et al. 2008).

Der Großteil des Wissens über die Funktion der DC bei der Entstehung der CED stammt aus Tierversuchen. In experimentellen Kolitis-Modellen bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass DC der Lamina propria an der Entstehung der chronischen Entzündung durch die Rekrutierung inflammatorischer Zellen, den Einfluss auf die epitheliale Barrierefunktion und die Einleitung einer pathologischen adaptiven Immunantwort beteiligt sind (Steinbach and Plevy 2014). Andererseits entwickeln Mäuse in Abwesenheit von DC spontan systemische Autoimmunität und Kolitis (Ohnmacht, Pullner et al. 2009). Loschko et al. konnten die besondere Rolle der Antigenpräsentation anhand von Mäusen mit fehlendem MHC (engl. major histocompatibility complex) Klasse II (murines Pendant zu HLA-DR) in DC demonstrieren. Diese entwickelten spontan eine Mikrobiom-abhängige Kolitis (Loschko, Schreiber et al. 2016). Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer ungestörten DC Funktion für die Immunhomöostase des Darms.

Doch auch bei Menschen mit CED gibt es zahlreiche Hinweise für die Verwicklung von DC in die Krankheitsentstehung, wie etwa deren Rekrutierung in den Darm bei akuter Entzündung, den höheren Anteil reifer, aktivierter DC oder die Veränderungen in Rezeptor- und Zytokinprofilen der DC bei Patienten mit MC oder CU (Rutella and Locatelli 2011, Steinbach and Plevy 2014).

Zellen der adaptiven Immunantwort

Das adaptive Immunsystem besteht aus T- und B-Lymphozyten und natürlichen Killer T-Zellen (NKT-Zellen). Diese bekämpfen Pathogene hoch spezifisch und sind in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Von besonderem Interesse im Kontext von CED sind die Th-Zellen. Effektor-Th-Zellen lassen sich in Th1-, Th2- und Th17-Zellen unterscheiden. Th1-Zellen sezernieren Interferon (IFN)- γ , welches zytotoxische T-Zellen und Makrophagen aktiviert und sich so vor allem gegen intrazelluläre Erreger richtet. Th2-Zellen produzieren IL-4, IL-5 und IL-13. Letzteres steht im Verdacht die epitheliale Barrierefunktion zu stören (Heller, Florian et al. 2005).

Zusätzlich scheint den erst 2005 erstmals beschriebenen Th17-Zellen (Langrish, Chen et al. 2005) eine wichtige Funktion zuzukommen (Weaver, Elson et al. 2013).

Diese produzieren unter anderem als hauptsächliche Effektor-Zytokine IL-17A und IL-17F, welche wiederum an der Aktivierung von NF- κ B- und MAPK-Signalwegen beteiligt sind, eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von Granulozyten spielen und in weiteren Zellen die Produktion von inflammatorischen Mediatoren, wie IL-6, TNF- α , Stickoxiden oder Metalloproteasen, und verschiedenen Chemokinen induzieren (Korn, Bettelli et al. 2009). Sowohl bei MC als auch bei CU wurden eine starke Infiltration von Th17-Zellen sowie hohe Level an Th17-Zytokinen im entzündeten Darmgewebe gefunden (Zenewicz, Antov et al. 2009). Bei CU Patienten korrelierte die Höhe des von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) sezernierten IL-17 mit der Schwere der Krankheit (Raza and Shata 2012) und GWAS zeigten eine Assoziation von Polymorphismen verschiedener Th17-bezogener Gene mit CED (Thompson and Lees 2011). Somit wurde zunächst angenommen, dass diese Zellen wesentlich zum Entzündungsgeschehen beitragen. Doch es mehren sich auch Hinweise für einen möglicherweise protektiven Effekt von IL-17-Zytokinen. So entwickelten beispielsweise Mäuse unter IL-17-Entzug mittels blockierendem Antikörper einen schwereren Verlauf einer experimentell herbeigeführten Kolitis (Ogawa, Andoh et al. 2004). Ein IL-17-neutralisierender Antikörper, der bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen des Menschen erfolgreich eingesetzt wird, führte bei Patienten mit MC teilweise sogar eine Verschlimmerung des Krankheitsverlaufs herbei (Hueber, Sands et al. 2012). Die Rolle der Th17-Zellen bei der CED Entstehung bleibt somit weiterhin nicht eindeutig geklärt.

Von großem Interesse in der CED Forschung sind außerdem regulatorische T-Zellen. Neben natürlichen Treg aus dem Thymus können induzierte Treg auch im peripheren Gewebe unter bestimmten Bedingungen entstehen. Aus einer naiven CD4⁺ Vorläufer-T-Zelle entwickelt sich unter dem Einfluss von TGF- β eine Treg durch die Induktion des Transkriptionsfaktors „forkhead box protein 3“ (Foxp3). Treg verhindern eine übersteigerte Immunantwort vorwiegend über die Ausschüttung von IL-10 und TGF- β sowie direkte Zell-Zell-Kontakte (Maloy, Salaun et al. 2003, Grossman, Verbsky et al. 2004, Pandiyan, Zheng et al. 2007). In zahlreichen funktionellen Studien am Mausmodell erwiesen sich Treg als protektiver Faktor bei intestinaler Entzündung (Asseman, Fowler et al. 2000, Gad 2005). Sie wurden bei Patienten mit CED simultan zu Darmentzündungen anderer Genese vermehrt vorgefunden und

zeigten *ex vivo* verglichen mit Treg von gesunden Kontroll-Probanden die gleichen suppressiven Eigenschaften (Mayne and Williams 2013). Somit scheint ein intrinsischer Defekt der Treg als Auslöser von CED weniger in Frage zu kommen. Doch offenbar ist ihre Wirkung auf entzündliche Effektor-Zellen bei CED nicht ausreichend, um die Entzündungsreaktion zu verhindern. Die Beobachtung, dass sich Foxp3⁺ Treg in Anwesenheit inflammatorischer Mediatoren, wie IL-6 und IL-23, in Th17-Zellen umwandeln können (Kitani and Xu 2008), gibt sogar Anlass zu bedenken, ob die Rekrutierung von Foxp3⁺ T-Zellen sogar negative Auswirkungen auf die Entzündungsaktivität haben kann. Dennoch liegt die Überlegung nahe, sich die immunmodulatorischen Eigenschaften der Treg therapeutisch zunutze zu machen.

Zytokine und Chemokine

Zytokine beeinflussen maßgeblich Wachstum, Differenzierung, Aktivierung und Funktion von Immunzellen und dirigieren somit die Richtung der Immunantwort. Einige wichtige Zytokine, die bei der Entstehung von CED eine Rolle spielen, sollen im Folgenden erläutert werden.

TNF- α wird vorwiegend von Monozyten und Makrophagen gebildet und bindet an zwei verschiedene Rezeptoren, die in zahlreichen Zellen und Geweben unterschiedlich exprimiert werden. Seine proinflammatorische Wirkung entfaltet es unter anderem durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1 (engl. activating protein-1). Sein Einfluss auf Endothelzellen bewirkt eine gesteigerte Adhäsion und transendotheliale Migration von Leukozyten (Liu 2005, Bradley 2008, Francescone, Hou et al. 2015). Der bereits erwähnte therapeutische Effekt der TNF- α -Blockade bei CED und anderen entzündlichen Erkrankungen unterstreicht dessen Rolle in der Krankheitsentstehung.

IL-6 wird ebenfalls von Monozyten und Makrophagen, aber auch T- und B-Lymphozyten gebildet. Bei CED Patienten und in experimentellen Kolitis-Modellen findet man hohe Konzentrationen von IL-6 in der intestinalen Lamina propria (Atreya, Mudter et al. 2000, Kai, Takahashi et al. 2005). IL-6 bindet an einen löslichen Rezeptor und aktiviert APC und T-Zellen. Insbesondere trägt es dabei zur Differenzierung inflammatorischer Th17-Zellen bei. (Francescone, Hou et al. 2015).

Diese wiederum sezernieren IL-17, welches bereits im vorangehenden Abschnitt behandelt wurde.

Die IL-12-Familie besteht aus den heterodimeren Zytokinen IL-12, IL-23, IL-27 und IL-35. Während IL-27 und IL-35 eher regulatorische Eigenschaften aufweisen, gelten IL-12 und IL-23, welche die gemeinsame Untereinheit IL-12p40 teilen, als entzündungsfördernde Zytokine. Sie werden vor allem von aktivierten APC während der Antigenpräsentation ausgeschüttet und fördern so die Entwicklung naiver T-Zellen zu Zytokin-produzierenden Th-Zellen (Sun, He et al. 2015). Die IL-12-induzierte Differenzierung von Th1-Zellen wird in die Entstehung zahlreicher immunologisch vermittelter Erkrankungen impliziert (Balashov, Smith et al. 1997, el-Shabrawi, Livir-Rallatos et al. 1998, Pope and Shahrara 2013). Ein humanisierter Antikörper gegen IL-12p40, Ustekinumab, wurde bereits in einer klinischen Studie erfolgreich für die Behandlung von MC getestet (Sandborn, Gasink et al. 2012).

Chemokine sind kleine Moleküle, die die Lokalisierung von Immunzellen steuern. Zellen, die den passenden Rezeptor tragen, wandern zum Ort der höchsten Konzentration des Chemokins. Man teilt Chemokine anhand der Anordnung ihrer Cystein-Reste-Struktur am N-terminalen Ende ihres kodierenden Gens in vier Gruppen ein: die „C“- , „CC“- , „CXC“- und die „CX₃C“-Subfamilie (Rollins 1997). CC-Chemokine sind insbesondere an der Rekrutierung von Lymphozyten und DC beteiligt, während CXC-Chemokine eher auf neutrophile Granulozyten und Monozyten wirken (Papadakis and Targan 2000). Sowohl bei MC als auch bei CU ist die mukosale Expression einer Vielzahl von Chemokinen erhöht, darunter CCL (CC-motif Ligand) 2-5, CCL8, CXCL1-3, CXCL8 und CXCL10 (Fina and Pallone 2008). Puleston et al. konnten eine besonders starke Hochregulierung der von ihnen untersuchten Chemokine und Chemokin-Rezeptoren (CXCL1, CXCL3, CXCL8, CCL20, CXCR1, CXCR2 und CCR6) bei CU im Vergleich zu MC feststellen (Puleston, Cooper et al. 2005).

Besondere Aufmerksamkeit erfährt in jüngster Zeit das Chemokin CCL20 mit seinem Rezeptor CCR6, das eine wichtige Rolle bei der Lokalisierung dendritischer Zellen in den Peyer-Plaques und damit der angeborenen Immunität gegenüber luminalen Antigenen spielt (Kunkel, Campbell et al. 2003). Die Expression von CCL20 und CCR6 ist bei Patienten mit aktiver CED gesteigert (Skovdahl, Granlund et al. 2015).

Zusätzlich wurde CCL20 vor kurzem als Suszeptibilitäts-Gen für CED identifiziert (Liu, van Sommeren et al. 2015). Eine Blockierung der CCL20-CCR6-Achse schützte Mäuse vor chemisch induzierter Kolitis (Varona, Cadenas et al. 2003, Teramoto, Miura et al. 2005) und wird daher auch als therapeutische Option für Patienten mit CED diskutiert.

Generell können Chemokine sowohl inflammatorische als auch regulatorische Effektor-Zellen an den Ort der Entzündung locken, weshalb die genaue Funktion eines Chemokins immer im Kontext der jeweiligen Erkrankung zu ermitteln ist.

1.3 Das Chemokin (C-C motif) Ligand 17 (CCL17)

1.3.1 Eigenschaften

1996 wurde CCL17 als im Thymus konstitutiv exprimiertes und in PBMC induzierbares Chemokin der CC-Familie erstmals unter dem Namen TARC (engl. thymus and activation regulated chemokine) beschrieben (Imai, Yoshida et al. 1996). Mittlerweile wurden im murinen System auch Makrophagen (Jakubzick, Wen et al. 2004, Achuthan, Cook et al. 2016), epidermale Langerhans-Zellen (LZ) (Xiao, Fujita et al. 2003) und DC (Alferink, Lieberam et al. 2003) sowie beim Menschen Keratinozyten (Komine, Kakinuma et al. 2005), Monozyten (Borriello, Longo et al. 2015, Achuthan, Cook et al. 2016), B-Zellen (Lin, Nonoyama et al. 2003) und DC (Soumelis, Reche et al. 2002, Perros, Hoogsteden et al. 2009) als CCL17-Produzenten identifiziert.

In DC wird CCL17 durch TNF- α und IFN- γ induziert (Komine, Kakinuma et al. 2005), während murine LZ ihre Produktion von CCL17 unter IFN- γ -Einfluss verringerten und nach Stimulation mit TNF- α und IL-4 hochregulierten (Xiao, Fujita et al. 2003). Weiterhin konnten Alferink et al. eine Induktion von CCL17 in DC mesenterialer Lymphknoten nach Stimulation mit TLR-Liganden im Mausmodell *in vivo* zeigen (Alferink, Lieberam et al. 2003). Als Stimuli für die Produktion von CCL17 in humanen DC wurden TSLP (engl. thymic stromal lymphopoietin), Histamin und Prostaglandin E2 (McIlroy, Caron et al. 2006) beschrieben. IL-4 und GM-CSF (engl. granulocyte macrophage colony-stimulating factor) induzieren CCL17 in humanen Monozyten (Borriello, Longo et al. 2015, Achuthan, Cook et al. 2016).

CCL17 und das strukturell eng verwandte CCL22, auch MDC (engl. macrophage derived chemokine) genannt, binden an den gemeinsamen Rezeptor CCR4 (Imai, Baba et al. 1997). CCR4 wird vorwiegend von Th2-Zellen (Sallusto, Lanzavecchia et al. 1998), aber auch anderen T-Zellen (Imai, Yoshida et al. 1996, Lieberam and Forster 1999), NK-Zellen (Inngjerdigen, Damaj et al. 2000), Makrophagen (Ness, Ewing et al. 2006) und DC (Sallusto and Lanzavecchia 1999) exprimiert.

1.3.2 Rolle in verschiedenen Krankheitsgeschehen

Der CCL17-vermittelten Rekrutierung von CCR4⁺ T-Zellen wird sowohl bei entzündlichen Erkrankungen als auch bei malignen Neoplasien eine Rolle zugeschrieben. Daran wird deutlich, dass CCL17 je nach Art der rekrutierten Zellen

pro- oder antientzündliche Wirkung haben kann. Bei den entzündlichen Krankheiten geht man von einem krankheitsfördernden Effekt durch die begünstigte Migration inflammatorischer Leukozyten aus, während bei Krebserkrankungen eine vermehrte Anziehung regulatorischer T-Zellen angenommen wird, welche eine effektive Immunantwort gegen den Tumor unterdrücken. So konnte ein CCR4-Antikörper in der klinischen Erprobung eine Krankheitsstabilisierung bei einigen Patienten mit fortgeschrittenem Lungen- oder Ösophaguskarzinom herbeiführen, einhergehend mit der Verminderung von Foxp3⁺ Treg und einer verstärkten Anti-Tumor-Immunreaktion (Kurose, Ohue et al. 2015).

Patienten mit atopischer Dermatitis zeigten eine starke Expression von CCL17-mRNA (engl. messenger ribonucleic acid) in ihren Hautläsionen, sowie erhöhte Serumspiegel von CCL17, welche mit der Krankheitsaktivität korrelierten (Saeki and Tamaki 2006, Kataoka 2014). Zudem gibt es Hinweise für die krankheitsauslösende Rekrutierung von CCR4⁺ Th2-Zellen durch CCL17 (Vestergaard, Bang et al. 2000, Nakatani, Kaburagi et al. 2001).

Auch bei allergischem Asthma zeigten sich hohe Level an CCL17 in den Atemwegen sowie im Blut (Berin 2002, Sekiya, Yamada et al. 2002). Perros et al. konnten in einem humanisierten Asthma-Modell die Aufhebung der Effekte eines experimentell herbeigeführten Asthmas durch einen blockierenden CCR4-Antikörper demonstrieren und identifizierten weiterhin DC als Hauptquelle für CCL17 (Perros, Hoogsteden et al. 2009).

Darüberhinaus wurde CCL17 bei einer Vielzahl weiterer allergischer bzw. immunologisch vermittelter Erkrankungen als potentieller Faktor in der Pathogenese identifiziert, darunter bei allergischer Rhinitis (Terada, Nomura et al. 2001), systemischem Lupus erythematoses (Okamoto, Koizumi et al. 2003), bullösem Pemphigoid (Saeki and Tamaki 2006), rheumatoider Arthritis (Moret, Hack et al. 2013), eosinophiler Pneumonie (Kato, Fukushima et al. 2003), Lungenfibrose (Belperio, Dy et al. 2004) und auch Atherosklerose (Weber, Meiler et al. 2011).

1.3.3 CCL17 in der Pathogenese intestinaler Entzündungen

Die Datenlage zur Expression von CCL17 bei intestinalen Entzündungen beim Menschen ist begrenzt. Autschbach et al. konnten eine verstärkte mRNA-Expression von CCL17 im entzündeten Darm von Patienten mit MC und CU nachweisen

(Autschbach, Giese et al. 2002). Eine Induktion gegenüber gesundem Gewebe konnte auch bei Darmentzündungen anderer Genese gezeigt werden, war jedoch geringer als bei den Patienten mit CED. Demgegenüber steht jeweils eine Publikation, die eine gesteigerte CCL17-mRNA-Expression entweder nur bei CU (Christophi, Rong et al. 2012) oder nur bei MC (Jugde, Alizadeh et al. 2001) nachweisen konnte.

Ausführlichere Daten liefern experimentelle Befunde aus Mausmodellen. Es existieren verschiedene Methoden, um bei Mäusen eine experimentelle Kolitis zu erzeugen. Dazu gehören die orale Applikation von Dextran-Natriumsulfat (DSS), der Transfer von T-Zellen in immundefiziente (T- und B-Zell-freie) Mäuse, der genetische Knockout von IL-10 und die Induktion der intestinalen Entzündung durch genetische Modifikation der TNF- α -mRNA mit gesteigerter TNF- α -Translation. In diesen Modellen wurde eine gesteigerte CCL17-Expression im entzündeten Darm beobachtet (Scheerens, Hessel et al. 2001, Viejo-Borbolla, Martin et al. 2010, Heiseke, Faul et al. 2012). Im Fall der T-Zell-Transfer-Kolitis konnte ein Rückgang der Induktion von CCL17 durch den Transfer von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, welche als Treg gelten, demonstriert werden (Kristensen, Brudzewsky et al. 2006).

Heiseke et al. zeigten anhand einer CCL17-Reporter-Maus eine Induktion von CCL17 in DC durch experimentell herbeigeführte Kolitis und beobachteten weiterhin, dass CCL17-defiziente Mäuse sowohl im DSS- als auch im T-Zell-Transfer-Modell eine deutlich mildere Kolitis entwickelten als Wildtyp-Mäuse (Heiseke, Faul et al. 2012). Diese Beobachtung ging mit einer niedrigeren Induktion proinflammatorischer Zytokine bei den *Ccl17*-Knockout-Mäusen einher. Interessanterweise konnte der protektive Effekt durch den Transfer von T-Zellen, denen der CCL17-Rezeptor CCR4 fehlte, in CCL17-kompetente Mäuse nicht erreicht werden. Ein *Ccr4*-Knockout der lymphopenen Empfängermaus jedoch schützte vor Kolitis durch den Transfer von Wildtyp-T-Zellen. Diese Entdeckung lässt vermuten, dass weniger die CCR4-vermittelte Rekrutierung von T-Zellen durch CCL17 als vielmehr ein CCR4-vermittelter Effekt auf Zellen des angeborenen Immunsystems die entzündliche Wirkung von CCL17 in diesem Modell erklärt. Diese These wird von der Beobachtung gestützt, dass DC von CCL17-defizienten Mäusen *in vitro* geringere Mengen an Zytokinen produzierten. Weiterhin war CCL17 in der Lage, CCL17-defiziente DC in Anwesenheit von TLR-Liganden zur Produktion von IL-12

anzuregen. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass CCL17 einen direkten auto- bzw. parakrinen Einfluss auf DC besitzt und dadurch inflammatorische Signalwege verstärkt.

1.4 Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit

Die weltweite Inzidenz der CED steigt. Bei vielen Patienten führen die verfügbaren Therapieoptionen nicht zu ausreichend zufriedenstellenden Ergebnissen. Das rasant wachsende Feld der zielgerichteten Immuntherapie bietet vielversprechende Behandlungsansätze für eine Vielzahl von Krankheiten. So ist es auch ein wichtiges Anliegen der CED Forschung, Zielstrukturen für neue Therapiemöglichkeiten zu identifizieren. Dem Chemokin CCL17 wird bei vielen immunvermittelten entzündlichen Erkrankungen eine Rolle in der Pathogenese zugeschrieben. Während über die Funktion von CCL17 bei der Entstehung von CED im humanen System noch wenig bekannt ist, liefern Tiermodelle nicht nur Hinweise für die inflammatorische Wirkung von CCL17 bei intestinalen Entzündungszuständen, sondern zeigen auch einen positiven Effekt der experimentellen Blockade von CCL17 auf den Krankheitsverlauf.

Ziel dieser Arbeit ist daher die Untersuchung der Expression von CCL17 bei CED Patienten im Hinblick auf eine Mögliche Funktion von CCL17 in der Pathogenese der CED beim Menschen.

Dazu wurde als erster Schritt die Expression von CCL17 auf mRNA-Ebene bei Patienten mit MC und CU im entzündeten und nicht entzündeten Darmgewebe untersucht sowie die CCL17-Konzentration im Blut bestimmt und mit den Werten bei gesunden Probanden verglichen.

Um weiterhin zu klären, welche Zellen im menschlichen Darm CCL17 produzieren, wurden einzelne Zellpopulationen der intestinalen Mukosa der Probanden hinsichtlich der Expression von CCL17 auf Protein- und mRNA-Ebene auf CCL17 untersucht.

Zur näheren Untersuchung der möglichen Funktion von CCL17 im Kontext der Darmentzündung wurde die Wirkung von CCL17 auf humane DC *in vitro* betrachtet.

2 Patienten, Material und Methoden

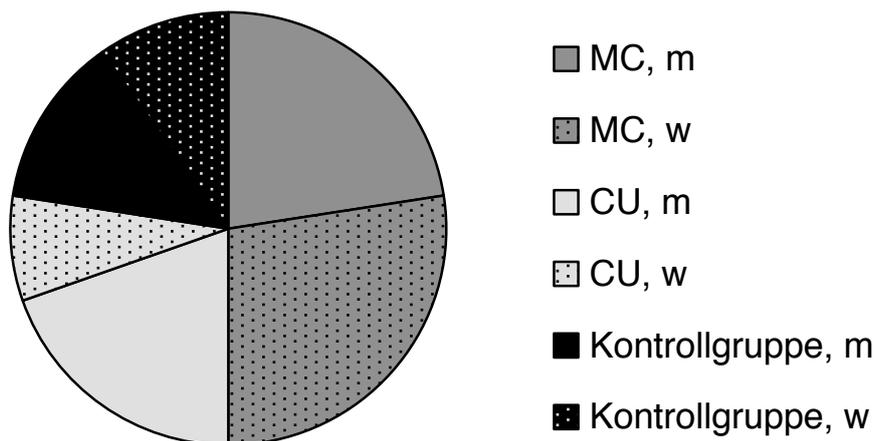
2.1 Patienten

Bei den Personen, die für die vorliegende Forschungsarbeit Gewebe oder Blut spendeten, handelt es sich um erwachsene Patienten, die sich am Klinikum Rechts der Isar, München, entweder einer endoskopischen Untersuchung durch die II. Medizinische Klinik oder einem operativen Eingriff durch die Chirurgische Klinik unterzogen.

Alle Patienten gaben nach ausführlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis für die Entnahme von Gewebe sowie die Erhebung und Speicherung von Daten anhand dieses Materials. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München genehmigt (Genehmigungsnummern: 5680/13 und 5738/13).

2.1.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 102 Personen im Zeitraum von Oktober 2012 bis November 2014 in die Gewebesammlung einbezogen, davon 51 Patienten mit MC, 28 Patienten mit CU und 23 Patienten, die nicht an CED litten, als gesunde Kontrollgruppe.



Gesamt = 102

Abb. 1. Patientenkollektiv.

Anzahl der eingeschlossenen Patienten und Zusammensetzung der Entitäten und Geschlechter.

Es wurden nur Patienten mit der Behandlungsdiagnose MC oder CU ausgewählt, bei denen der endoskopische Befunde, die histopathologische Untersuchung und die klinische Einschätzung durch einen Facharzt für Gastroenterologie keinen Zweifel an der Diagnose ergaben. Patienten mit nicht-klassifizierter Kolitis (Colitis indeterminata) wurden ausgeschlossen. In die Kontrollgruppe wurden Patienten eingeschlossen, die sich entweder einer Vorsorge-Koloskopie unterzogen (12 Patienten) oder einer Operation, bei der gesundes Darmgewebe gewonnen werden konnte (11 Patienten). Konkret handelte es sich bei diesen Operationen um 7 Stomarückverlagerungen bei maligner Grunderkrankung und 4 Kolon-Teilresektionen bei kolorektalen Neoplasien (1 Adenom, 3 Karzinome).

In der Gruppe der MC Patienten waren 23 Männer und 28 Frauen zwischen 18 und 75 Jahren. Das durchschnittliche Alter (Mittelwert) lag bei 36,7 Jahren und die Erkrankungsdauer reichte von 1 Monat bis zu 34 Jahren bei einem Durchschnitt von 10,9 Jahren. Bei 3 Patienten war die Erkrankungsdauer nicht eruierbar.

Die Gruppe der CU Patienten bestand aus 20 Männern und 8 Frauen im Alter von 22 bis 79 Jahren bei einem Altersdurchschnitt von 39,3 Jahren. Die Erkrankungsdauer lag zwischen 2 Monaten und 32 Jahren, im Mittel 8,9 Jahre.

Die Kontrollgruppe bildeten 13 Männer und 10 Frauen zwischen 32 und 83 Jahren. Der Altersdurchschnitt lag hier bei 56,1 Jahren.

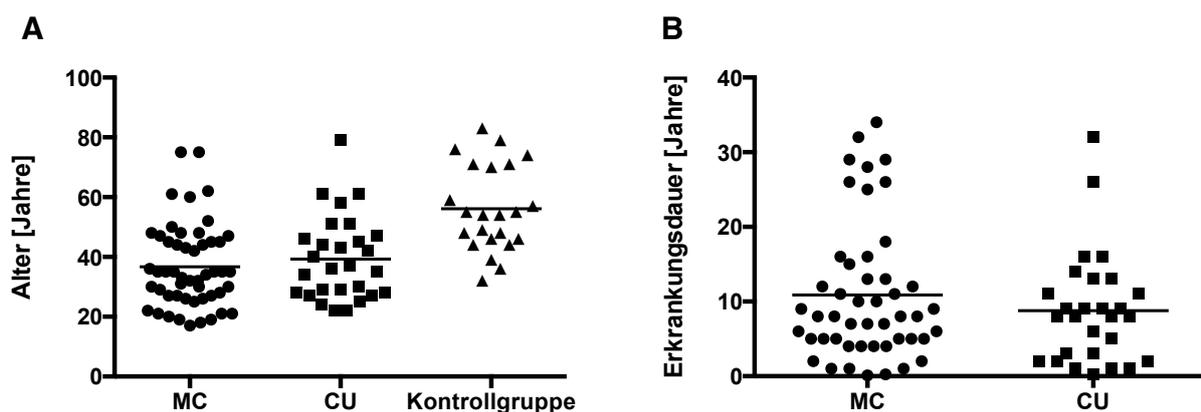


Abb. 2. Alter (A) und Erkrankungsdauer (B) der Patienten.

Jeder Punkt repräsentiert ein Individuum, ein Balken signalisiert den Mittelwert.

Die meisten der MC und CU Patienten standen unter CED-spezifischer Therapie.

Abb. 3 gibt einen Überblick über die Therapeutika, die dabei zum Einsatz kamen.

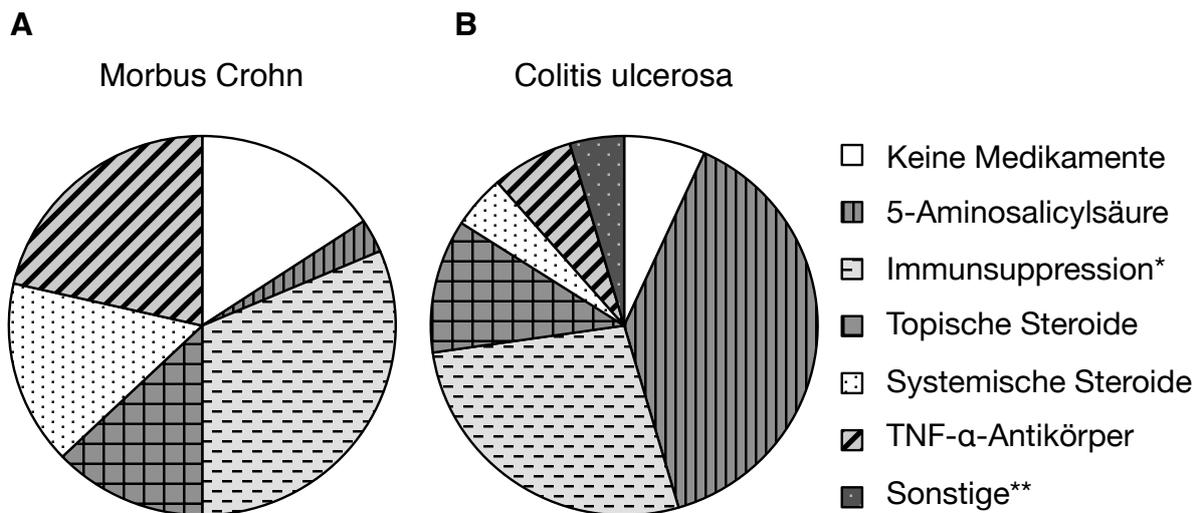


Abb. 3. Medikamentöse Therapie der CED Patienten.

(A) Patienten mit MC; *als Immunsuppressiva kamen Azathioprin/6-Mercaptopurin (6-MP) (21 Patienten) und Cyclophosphamid (1 Patient) zum Einsatz. **(B)** Patienten mit CU; *Immunsuppressiva: Azathioprin/6-MP (7 Patienten), Cyclosporin (2 Patienten), Tacrolimus (2 Patienten), **Sonstige Medikamente: Mutaflor®, Sojagranulat (je 1 Patient)

23 MC Patienten wurden mit einem einzigen Wirkstoff behandelt, 17 standen unter einer Kombinationstherapie. In der CU Gruppe erhielten 11 Patienten eine Monotherapie, 14 Patienten wurden mit mehr als einem Medikament gleichzeitig behandelt.

Weiterhin spendeten 61 Probanden Blut für die serologische Untersuchung. Dabei handelte es sich um 16 MC Patienten, davon 8 in Remission und 8 mit aktiver Erkrankung, 19 CU Patienten, 8 in Remission und 11 mit Krankheitsaktivität, und 26 gesunde Personen. Diese Spender sind teilweise identisch mit den Gewebespendern.

2.1.2 Probengewinnung

Bei MC Patienten wurde sowohl Dickdarm als auch Dünndarm untersucht, bei Patienten mit CU beschränkte sich die Probenentnahme auf den Dickdarm. Es wurden Proben aus entzündeten und aus nicht entzündeten Darmabschnitten entnommen. Wiesen Patienten gleichzeitig entzündete und nicht entzündete Areale

auf, so wurden von beiden Stellen Proben entnommen. Somit wurden von MC Patienten von bis zu 4 verschiedenen Stellen Biopsien gewonnen, von CU Patienten wurden bis zu 2 unterschiedliche Gewebeproben genommen.

Die Einteilung in entzündetes oder nicht entzündetes Gewebe erfolgte nach makroskopischen Aspekten und wurde durch den endoskopierenden Arzt oder den das Operationspräparat sichtenden Pathologen vorgenommen.

Abb. 4 gibt einen Überblick über die Art der Probengewinnung in den jeweiligen Kategorien.

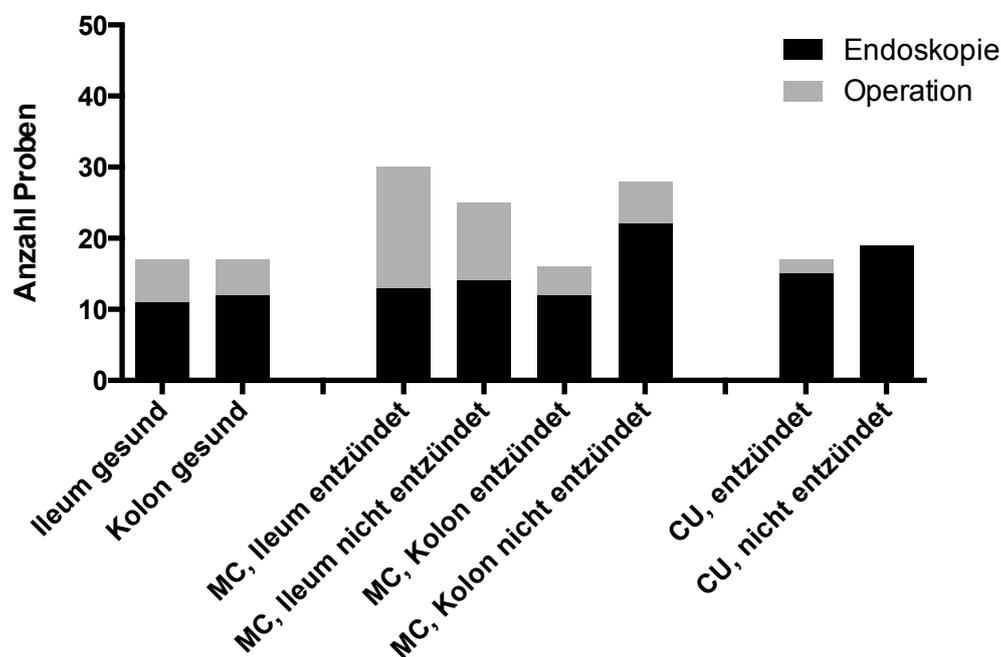


Abb. 4. Anzahl der Proben in den einzelnen Kategorien und Art der Probengewinnung. Von einem Spender stammen ein bis vier Einzelproben.

Endoskopie

Bei der endoskopischen Probengewinnung wurden jeweils wenige Millimeter große Mukosafragmente mit einer Probenexzisions-Zange abgetragen und in sterile, auf 4 °C vorgekühlte PBS (engl. phosphate buffered saline)-Lösung überführt. Hatte die Zange zuvor aufgrund der Probenentnahme für die pathologische Diagnostik Kontakt zu Formalin-Lösung, wurde sie vorher in sauberer PBS-Lösung gespült. Das Gewebe wurde unmittelbar nach der letzten Probenentnahme auf Eis ins Labor transportiert und weiterverarbeitet.

Operationen

Von den Operations-Präparaten wurden möglichst unmittelbar nach Resektion Gewebestücke abgetrennt und in sterile, auf 4 °C vorgekühlte PBS-Lösung übertragen. Die Entnahme von gesundem Kontroll-Gewebe erfolgte dabei möglichst nahe des Resektionsrandes und weit entfernt vom Tumor oder dem potentiell gereizten oder regenerativ veränderten Stomarand.

Nach Abwaschen des Mukus vom Präparat wurde die Mukosa abpräpariert und unmittelbar weiterverarbeitet.

Blutentnahme und Serumgewinnung

Die venöse Blutentnahme erfolgte aus einer zum Zweck der Sedierung gelegten Venenverweilkanüle vor der endoskopischen Untersuchung oder im Rahmen der klinischen Diagnostik. Dazu wurden Serum-Gel Monovetten von Sarstedt (Nümbrecht, D) verwendet. Diese wurden nach der Blutentnahme mindestens 30 min zur Gerinnung stehen gelassen. Dann erfolgte die Zentrifugation 10 min lang bei 3000 g und Raumtemperatur. Anschließend wurde das Serum abpipettiert und bis zur Analyse bei -80 °C eingefroren.

Vor der Analyse wurde unterschieden, ob sich der Spender des Serums aktuell in Remission oder in einem aktiven Stadium seiner Erkrankung befand. Kriterien für Remission waren dabei klinische Beschwerdefreiheit und unauffälliger endoskopischer Befund. Als aktiv wurde die Erkrankung klassifiziert, wenn klinische Beschwerden und eine in der Endoskopie sichtbare Entzündung vorlagen. War das Ergebnis der endoskopischen Untersuchung nicht im Einklang mit der Klinik, wurde das Serum des Patienten nicht in die Analyse einbezogen.

2.2 Material

2.2.1 Reagenzien, Enzyme und Lösungen

Molekularbiologische Methoden

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
2-Propanol	Merck (Darmstadt, D)
5x FS Buffer	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Chloroform	Merck (Darmstadt, D)
dNTP mix	Promega (Mannheim, D)
DTT 0,1 M	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Ethanol, absolut	Merck (Darmstadt, D)
H ₂ O ultra pure DNase/RNase frei	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Oligo (dT) ₁₅	Promega (Mannheim, D)
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden, D)
SuperScript III reverse Transcriptase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
TaqMan Real-Time PCR Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
TRIzol reagent	Invitrogen (Karlsruhe, D)

Zellisolation und Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Biocoll-Trennlösung (1,077 g/ml, isotonisch)	Biochrom (Berlin, D)
CCL17, rekombinant, human	R&D Systems (Wiesbaden, D)
Collagenase D	Roche (Mannheim, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Seelze, D)
DNase I	Roche (Mannheim, D)
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Fetal calf serum (FCS)	PAN-Biotech (Aidenbach, D)
Glutamax-I (100x)	Gibco (Karlsruhe, D)
GM-CSF, rekombinant, human	PeptoTech (Hamburg, D)
Golgi-Plug	BD Bioscience (Heidelberg, D)
Golgi-Stop	BD Bioscience (Heidelberg, D)
IL-4, rekombinant, human	PeptoTech (Hamburg, D)
Lipopolysaccharid aus E. coli 0111:B4 (LPS)	Sigma-Aldrich (Seelze, D)
β-Mercaptoethanol (14,3 M)	Sigma-Aldrich (Seelze, D)
Non-essential Amino Acids (NEAA, 100x)	PAA (Pasching, A)
PBS (ohne Ca und Mg)	Gibco (Karlsruhe, D)
Penicillin-Streptomycin	PAA (Pasching, A)
Red Blood Cell Lysing Buffer	Sigma-Aldrich (Seelze, D)
RPMI 1640	Gibco (Karlsruhe, D)
RPMI 1640	Promocell (Heidelberg, D)
Sodium Pyruvat	PAA (Pasching, A)

Durchflusszytometrie / fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
10x Permeabilization Buffer	eBioscience (Frankfurt am Main, D)
FcR Blocking Reagent, human	Miltenyi (Bergisch Gladbach, D)
Fixable viability dye, eFluor 450	eBioscience (Frankfurt am Main, D)
Fixation/Permeabilization Concentrate	eBioscience (Frankfurt am Main, D)
Fixation/Permeabilization Diluent	eBioscience (Frankfurt am Main, D)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich (Seelze, D)

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Bovines Serum Albumin (BSA, Fraktion V)	Serva (Heidelberg, D)
Color Reagent A (H ₂ O ₂)	R&D Systems (Wiesbaden, D)
Color Reagent B (Tetramethylbezidin)	R&D Systems (Wiesbaden, D)
H ₂ SO ₄ , 2N	Roth (Karlsruhe, D)
Normal Goat Serum	Dianova (Hamburg, D)
Streptavidin-HRP	R&D Systems (Wiesbaden, D)
Tween-20	Sigma-Aldrich (Seelze, D)

2.2.2 Primer

Für die quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurden folgende TaqMan Real-Time PCR Assays von Applied Biosystems (Darmstadt, D) verwendet:

Ziel-Gen	Context Sequence	Assay ID
CCL17	5'-ACA TCC ACG CAG CTC GAG GGA CCA A-3'	Hs00171074_m1
CCL22	5'-AAC TGA GGC AGG CCC CTA CGG CGC C-3'	Hs01574247_m1
Foxp3	5'-GGC TTC ATC TGT GGC ATC ATC CGA C-3'	Hs01085834_m1
HPRT1	5'-GGA CTA ATT ATG GAC AGG ACT GAA C-3'	Hs02800695_m1
IL-17A	5'-GAA TCT CCA CCG CAA TGA GGA CCC T-3'	Hs00174383_m1

Alle beinhalteten Probes waren Exon-übergreifend und detektierten somit keine genomische DNA.

2.2.3 Antikörper und Protein-Standards

Durchflusszytometrie / fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Antigen, Fluorochrom	Spezies-Isotyp	Klon-Nr.	Hersteller/Bezugsquelle
CCL17, PE	Maus, IgG1	54015	R&D Systems
CD3, FITC	Maus, IgG1, κ	SK7	eBioscience
CD11c, APC	Maus, IgG1, κ	3.9	BioLegend
CD11c, PerCp-Cy5.5	Maus, IgG1, κ	3.9	BioLegend
CD14, PE-Cy7	Maus, IgG2a, κ	M5E2	BioLegend
CD14, PE-Vio 770	Maus, IgG2a	TÜK4	Miltenyi Biotec
CD19, FITC	Maus, IgG1, κ	HIB19	BioLegend
CD20, FITC	Maus, IgG2b, κ	2H7	eBioscience
CD45, AF 700	Maus, IgG1, κ	HI30	BioLegend
CD45, APC	Maus, IgG1, κ	HI30	BioLegend
CD56, FITC	Maus, IgG2a, κ	MEM-188	BioLegend
CD64, AF 647	Maus, IgG1, κ	10.1	BioLegend
CD64, BV 421	Maus, IgG1, κ	10.1	BioLegend
CD83, AF 647	Maus, IgG1, κ	HB15e	BioLegend
CD86, BV 421	Maus, IgG2b, κ	IT2.2	BioLegend
HLA-DR, BV 605	Maus, IgG2a, κ	L243	BioLegend
HLA-DR, PE	Maus, IgG2a, κ	L243	BioLegend
Isotypen-Kontrolle, PE	Maus, IgG1	11711	R&D Systems

Die Antikörper wurden von BioLegend (London, UK), eBioscience (Frankfurt, D), Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) und R&D Systems (Wiesbaden, D) bezogen.

Enzymel linked immunosorbent assay (ELISA)

Antikörper/Protein	Spezies-Isotyp/Ursprung	Funktion
<i>CCL17</i>		
Anti-CCL17, human	Maus, IgG1, monoklonal	Capture
Anti-CCL17, human, biotinyliert	Ziege, IgG, polyklonal	Detection
CCL17, rekombinant, human	<i>E. coli</i>	Standard
<i>IL-6</i>		
Anti-IL-6, human	Maus, IgG1, monoklonal	Capture
Anti-IL-6, human, biotinyliert	Ziege, IgG, polyklonal	Detection
IL-6, rekombinant, human	<i>E. coli</i>	Standard
<i>IL-12p40</i>		
Anti-IL-12p40, human	Maus, IgG1, monoklonal	Capture
Anti-IL-12p40, human, biotinyliert	Ziege, IgG, polyklonal	Detection
IL-12p40, rekombinant, human	Sf 21 (Baclovirus)	Standard

Antikörper/Protein	Spezies-Isotyp/Ursprung	Funktion
<i>TNF-α</i>		
Anti-TNF- α , human	Maus, IgG1, monoklonal	Capture
Anti-TNF- α , human, biotinyliert	Ziege, IgG, polyklonal	Detection
TNF- α , rekombinant, human	<i>E. coli</i>	Standard

Alle ELISA-Antikörper und Protein-Standards wurden als DuoSets von R&D Systems (Wiesbaden, D) bezogen.

Magnetic Cell Separation (MACS)

Antigen, Konjugat	Spezies-Isotyp	Klon-Nr.	Hersteller/Bezugsquelle
CD14, MicroBeads	Maus, IgG2a	k.A.	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

2.2.4 Puffer und Medien

DC-Vollmedium	RPMI 1640 (Promocell) 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Glutamax-I 1 % (v/v) NEAA 1 % (v/v) Penicillin/Sterptomycin 1 % (v/v) Sodium Pyruvat 0,05 mM β -Mercaptoethanol
Einfrier-Medium	FCS 10 % (v/v) DMSO
ELISA Blockpuffer	PBS 1 % (w/v) BSA pH: 7,2-7,4
ELISA Reagent Diluent	PBS 1 % (w/v) BSA pH: 7,2-7,4
ELISA Waschpuffer	PBS 0,05 % (v/v) Tween-20 pH: 7,2-7,4
FACS-Puffer (Kulturzellen)	PBS 2 % (v/v) FCS

FACS-Puffer (Darmzellen) PBS
2 % (v/v) FCS
2 mM EDTA

MACS-Puffer PBS
2 % (v/v) FCS
2 mM EDTA

2.3 Methoden

2.3.1 Molekularbiologische Methoden

RNA-Isolation aus Gewebe und Zellen

Um die Expression der Gene für CCL17, CCL22, Foxp3 und IL-17A auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde sowohl aus frisch gewonnenem Mukosa-Gewebe als auch aus einzelnen Zellpopulationen, die aus diesem Gewebe separiert wurden, Gesamt-RNA isoliert.

Zur RNA-Gewinnung aus Mukosa-Fragmenten wurden 2-10 mm² des Gewebes in 0,5 ml TRIzol aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mechanisch homogenisiert. Die RNA-Isolation erfolgte gemäß Protokoll des Herstellers.

Zusammengefasst wurde die Probe nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur (RT) zur Zersetzung der Zellmembranen und Freisetzung des Zellinhaltes mit 100 µl Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt, 3 min bei RT inkubiert und 15 min bei 4 °C und 11000 g zentrifugiert, um eine Auftrennung des Gemisches in eine die RNA enthaltende, wässrige obere Phase, eine Interphase und eine DNA und Proteine enthaltende, organische untere Phase zu erreichen. Die wässrige Phase wurde abgenommen und zum Ausfällen der RNA mit 250 µl 2-Propanol gemischt. Nach 10 min Inkubationszeit wurde erneut bei 4 °C und 11000 g 10 min lang zentrifugiert und anschließend das gebildete Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen. Zur vollständigen Entfernung des Ethanols wurde das Pellet 5 min luftgetrocknet. Schließlich wurde die RNA, je nach Größe des entstandenen Pellets, in 20 - 60 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Dazu wurde die Probe für 5 min auf 55 °C erhitzt.

Die RNA-Isolation aus gesorteten Zellen erfolgte ebenfalls nach der auf Trizol und Chloroform basierenden Methode, allerdings wurde die Aufreinigung der RNA aus der wässrigen Phase mittels Spinsäulen aus dem RNeasy Kit von Qiagen (Hilden, D) vorgenommen. Das Vorgehen wurde an ein Protokoll von A. Untergasser (Untergasser 2008) angelehnt:

Die Zellen wurden in 250 µl Trizol aufgenommen und nach 5 min Inkubation mit 50 µl Chloroform vermischt. Die nächsten Schritte entsprachen dem oben beschriebenen Vorgehen. Nach abnehmen der wässrigen Phase wurde diese mit 150 µl 70 % Ethanol versetzt, auf die Separations-Säule übertragen und bei 8000 g für 15 sec zentrifugiert. Nacheinander wurde die Säule mit 700 µl „RW1“-Puffer und zwei mal

mit 500 µl „RPE“-Puffer gespült. Dazwischen wurde jeweils bei 8000 g zentrifugiert, 15 sec lang nach den ersten beiden Schritten, 2 min lang nach dem dritten Schritt. Um die Säule zu trocknen, wurde sie bei maximaler Geschwindigkeit 2 min lang zentrifugiert. Durch Aufbringen von 30 µl RNase-freiem Wasser auf die Membran der Säule wurde die RNA aus der Säule gelöst und die Lösung nach einer einminütigen Inkubationszeit durch 1 min Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in ein Auffanggefäß abgetrennt.

Der RNA-Gehalt wurde photometrisch an einem NanoDrop 2000C Spektrometer von Thermo Scientific (Braunschweig, D) bestimmt und Zeichen der Degradation in der Absorptionskurve ausgeschlossen.

Reverse Transkription

Für die Synthese von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) aus RNA wurden 2 µg Gesamt-RNA in 11 µl RNase-freiem Wasser eingesetzt. Standen diese aufgrund zu geringer Mengen des Ausgangsmaterials nicht zur Verfügung, wurden 11 µl der in Wasser gelösten RNA in höchstmöglicher Konzentration eingesetzt.

Nach Zugabe von je einem µl Oligo(dT)₁₅ und dNTP Mix wurde die RNA-Lösung für 5 min in einem C1000 Thermal Cycler von BioRad (München, D) auf 65 °C erhitzt. Anschließend wurde die Mischung auf 4 °C abgekühlt und nach 1 min Inkubation mit 4 µl 5x First-Strand Puffer, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl Ribolock und 1 µl SuperScript III RT versetzt. Die reverse Transkription fand im Cycler bei 50 °C für 60 min statt. Um die reverse Transkriptase zu inaktivieren wurde die Temperatur abschließend für 15 min auf 70 °C erhöht. Das Produkt wurde mit 100 µl RNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C aufbewahrt. Wurden weniger als 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt und war die zu erwartende Menge an cDNA sehr gering, wurde sie lediglich 1:1 verdünnt.

Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR wurde eingesetzt, um die Genexpression von CCL17, CCL22, Foxp3 und IL-17A in der Gesamt-Mukosa und in einzelnen mukosalen Leukozytenpopulationen zu bestimmen.

In einem 20 µl Reaktionsansatz wurden 10 µl TaqMan Real-Time PCR Master Mix, 1 µl TaqMan Sonde und 9 µl cDNA-Lösung eingesetzt. Alle eingesetzten Sonden waren Exon-übergreifend und detektierten somit keine genomische DNA.

Die Durchführung erfolgte mit 40 Zyklen an einem StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, D).

In einigen wenigen Proben konnte keine cDNA des jeweiligen Zielgens bestimmt werden. Diese Ergebnisse gingen nicht in die Auswertung mit ein und sind auch in der Statistik nicht berücksichtigt. Eine Ausnahme bilden hier die Ergebnisse der mittels FACS sortierten Leukozytenpopulationen. Wie in diesem Fall bei nicht detektierbarem Zielgen vorgegangen wurde, wird im Ergebnisteil erläutert.

Die Auswertung erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak and Schmittgen 2001). Dabei handelt es sich um eine Form der relativen Quantifizierung. So wird die Expression des Zielgenes zunächst in Relation zu einer endogenen Kontrolle gesetzt. In diesem Fall diente dazu das Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*) Gen. Durch Subtraktion des „cycle threshold“ Wertes (Ct-Wert) für HPRT1 vom Ct-Wert des Zielgenes erhält man den ΔCt -Wert. Bildet man die Differenz aus den ΔCt -Werten zweier Proben ($\Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$) und wendet auf den so entstandenen $\Delta\Delta Ct$ -Wert die Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ an, so sagt das Ergebnis dieser Rechnung aus, um welchen Faktor die Expression des Zielgenes in Probe 1 gegenüber Probe 2 erhöht ist. Ist das Gen in Probe 1 schwächer exprimiert als in Probe 2, erhält man dementsprechend einen Wert kleiner 1.

Üblicherweise wird nun auf diese Art und Weise die Genexpression in einer spezifisch behandelten Probe mit der einer unbehandelten Kontrolle verglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde folgendermaßen verfahren: Die ΔCt -Werte aller zu untersuchenden Proben wurden auf den jeweiligen ΔCt -Wert eines immer gleichen Kalibrators bezogen. Der Grund für dieses Vorgehen liegt darin, dass mehrere separate qRT-PCR-Durchläufe nötig waren, um alle Proben auf die vier untersuchten Zielgene hin zu analysieren. Da eine geringe Varianz in der Replikationseffizienz zwischen einzelnen Durchläufen nicht zu vermeiden ist, können ΔCt -Werte aus unterschiedlichen Ansätzen nicht ohne Weiteres miteinander verglichen werden. Der hier verwendete Kalibrator dient als Eich-Größe, da er in jedem qRT-PCR-Ansatz für alle detektierten Gene neu pipettiert wurde. Die ΔCt -Werte aus unterschiedlichen Durchgängen sind somit miteinander vergleichbar, sofern sie auf den jeweiligen ΔCt -Wert des Kalibrators bezogen werden. Die Ergebnisse werden als relative RNA-Expression angegeben. Diese besagt, um welchen Faktor die Expression gegenüber dem Kalibrator gesteigert ist.

Als Kalibrator diente cDNA, die aus der Kolonmukosa eines gesunden Probanden gewonnen wurde. Diese wurde nach der Synthese aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Für jeden Ansatz wurde ein frisches Aliquot verwendet, um wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu vermeiden.

Die Expression der untersuchten Gene in der als Kalibrator verwendeten Probe liegt nahe an der durchschnittlichen Expression dieser Gene in gesunden Kontrollen. Dies ist zwar nicht unbedingt notwendig, um die auf den Kalibrator bezogenen Proben miteinander vergleichen zu können, erleichtert jedoch die intuitive Interpretation der Ergebnisse.

Die Anwendung der hier beschriebenen Quantifizierungsmethode ist nur zulässig, wenn die Amplifikationseffizienz der qRT-PCR für das Zielgen und das interne Kontrollgen vergleichbar ist. Um dies für die hier untersuchten Gene nachzuweisen, wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt und mit Hilfe der zu den jeweiligen Genen zugehörigen linearen Regressionsgeraden die Amplifikationseffizienz E bestimmt (Rasmussen 2001). cDNA einer Probe aus Kolonmukosa wurde fünfmal im Verhältnis 1:5 verdünnt. Für die 6 verschiedenen Konzentrationen wurde die qRT-PCR wie oben beschrieben für HPRT1, CCL17, CCL22, Foxp3 und IL-17A durchgeführt. Der gesamte Ansatz wurde in Duplikaten ausgeführt. Anschließend erfolgte die Auftragung der Ct-Mittelwerte gegen die Konzentration, wie in Abb. 5 gezeigt.

Zur Berechnung der Amplifikationseffizienz wurde die Formel $E=10^{(-1/\text{Steigung})}$ verwendet. Die Steigung der linearen Regressionsgeraden wurde mit Hilfe der GraphPad Prism Software (La Jolla, USA) ermittelt.

Mit einer Amplifikationseffizienz zwischen 1,80 und 1,84 lagen die Zielgene ausreichend nahe an der internen Kontrolle, die eine Effizienz von 1,85 aufwies.

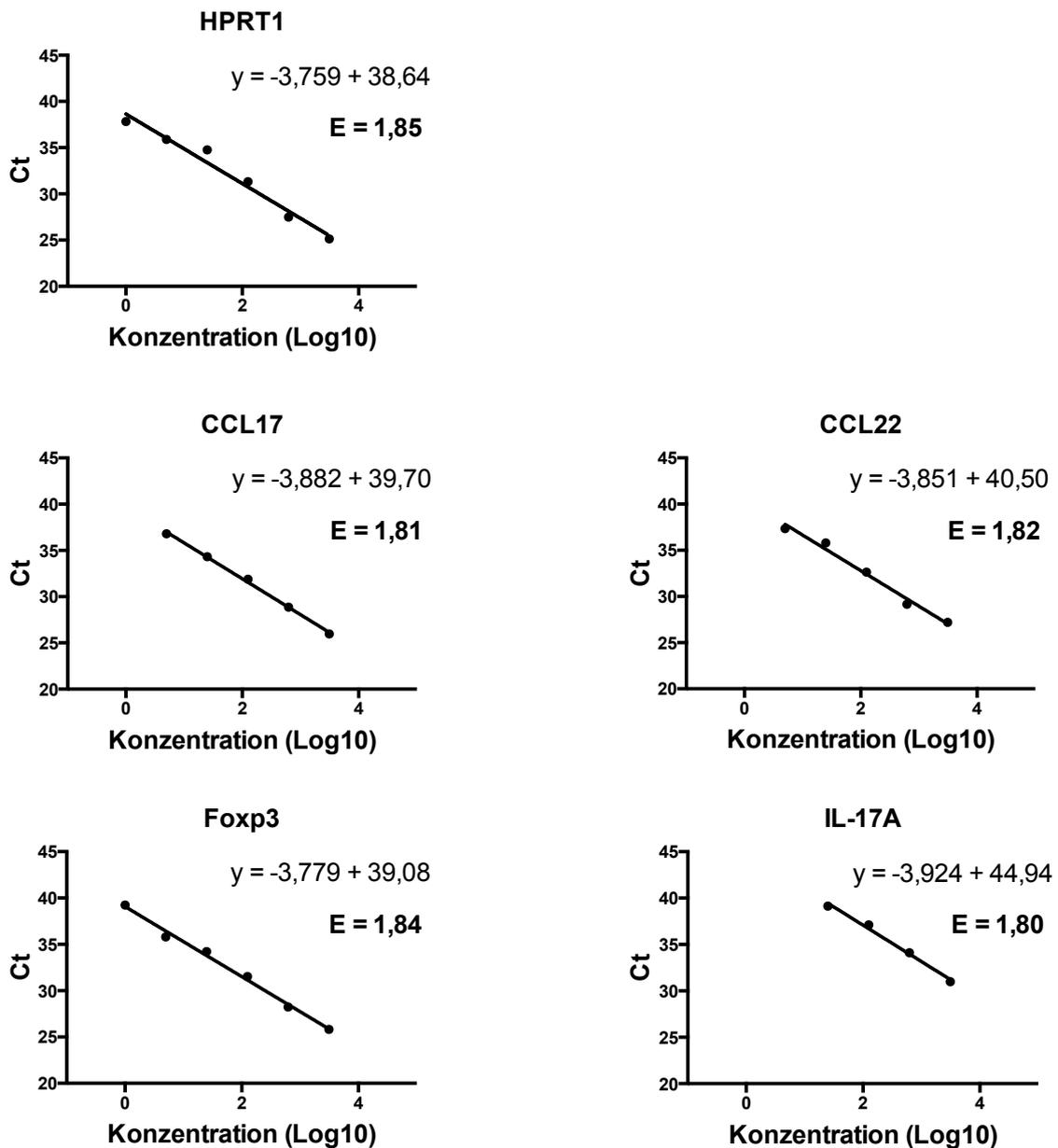


Abb. 5. Amplifikationseffizienzen (E) der qRT-PCR.

Y-Achse: Ct-Wert; X-Achse: Log10 der Konzentration. Weiterhin wird die lineare Regressionsgerade mit zugehöriger Gleichung gezeigt.

2.3.2 Durchflusszytometrie / fluorescence-activated cell sorting (FACS)

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie sowohl zur Analyse als auch zur Separierung einzelner Zellpopulationen eingesetzt. Da sich der Begriff FACS im allgemeinen Sprachgebrauch auch für die reine durchflusszytometrische Analyse durchgesetzt hat, werden die Begriffe auch hier synonym verwendet. Auf eine Sortierung von Zellen mittels FACS wird explizit hingewiesen.

Die Durchflusszytometrie wurde zur phänotypischen Charakterisierung von DC und zur Kontrolle der Reinheit nach MACS (engl. magnetic cell separation) eingesetzt.

Nach dem Ernten wurden die Zellen zur Reduzierung unspezifischer Bindungen in FACS-Puffer mit 2,5 % (v/v) „FcR Blocking Reagent“ (FC-Block) aufgenommen und 15 min lichtgeschützt bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (450 g, 5 min, 4 °C) erfolgte die Färbung in einer 96-Loch Rundbodenplatte in 100 µl FACS-Puffer mit jeweils 1 µl oder 2,5 µl FACS-Antikörpern für 20 min lichtgeschützt bei 4 °C. Es wurde zusätzlich für jedes verwendete Fluorochrom eine Einzelfärbung, sowie eine ungefärbte Negativkontrolle angefertigt. Die meisten Antikörper wurden im Verhältnis 1:100 eingesetzt, lediglich die Antikörper gegen CD11c, konjugiert mit PerCP-Cy5.5, und CD64, mit dem Fluorochrom AF647, wurden im Verhältnis 1:40 verwendet.

Die Zellen wurden zweimal mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 450 g, 5 min, 4 °C) und dann in einem Volumen von 150 – 200 µl analysiert. Zur Markierung toter Zellen wurden kurz vor der Analyse 5 µl 5 %-iges Propidiumiodid (PI) hinzugefügt.

Darüber hinaus wurde ein Protokoll zur intrazellulären Färbung von CCL17 in humanen Mukosazellen entwickelt. Dabei wurden die Zellen zunächst 30 min lichtgeschützt bei 4 °C mit dem fixable viability dye, 1:1000 in PBS verdünnt, inkubiert, einmal gewaschen (FACS-Puffer, 450 g, 5 min, 4 °C), dann erfolgte wie oben beschrieben die Behandlung mit FC-Block und die Oberflächenfärbung. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl Fixierungspuffer (1:4-Mischung aus „Fixation/Permeabilization Concentrate“ und „Fixation/Permeabilization Diluent“) 30 min lichtgeschützt bei 4 °C fixiert. Die Intrazellulärfärbung der gewaschenen (200 µl FACS-Puffer, 450 g, 5 min, 4 °C) Zellen erfolgte dann in 100 µl Permeabilisierungspuffer mit 2,5 % (v/v) FC-Block und 2,5 µl des intrazellulären Antikörpers bzw. der Isotypen-Kontrolle für 20 min lichtgeschützt bei 4 °C. Die Zellen wurden einmal intrazellulär mit Permeabilisierungspuffer und ein weiteres mal mit FACS-Puffer gewaschen (je 200 µl, 450 g, 5 min, 4 °C). Die Analyse erfolgte in 200 µl FACS-Puffer.

Die Messung wurde an einem Gallios-Durchflusszytometer (10 Farben, 3 Laser) von Beckman Coulter (Krefeld, D) durchgeführt, zur Auswertung diente die FlowJo-Software, Version 10.2 (Ashland, USA).

In den im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigten Grafiken wurden bereits Zell-Debris und tote Zellen ausgeschlossen, wie in Abb. 6 dargestellt.

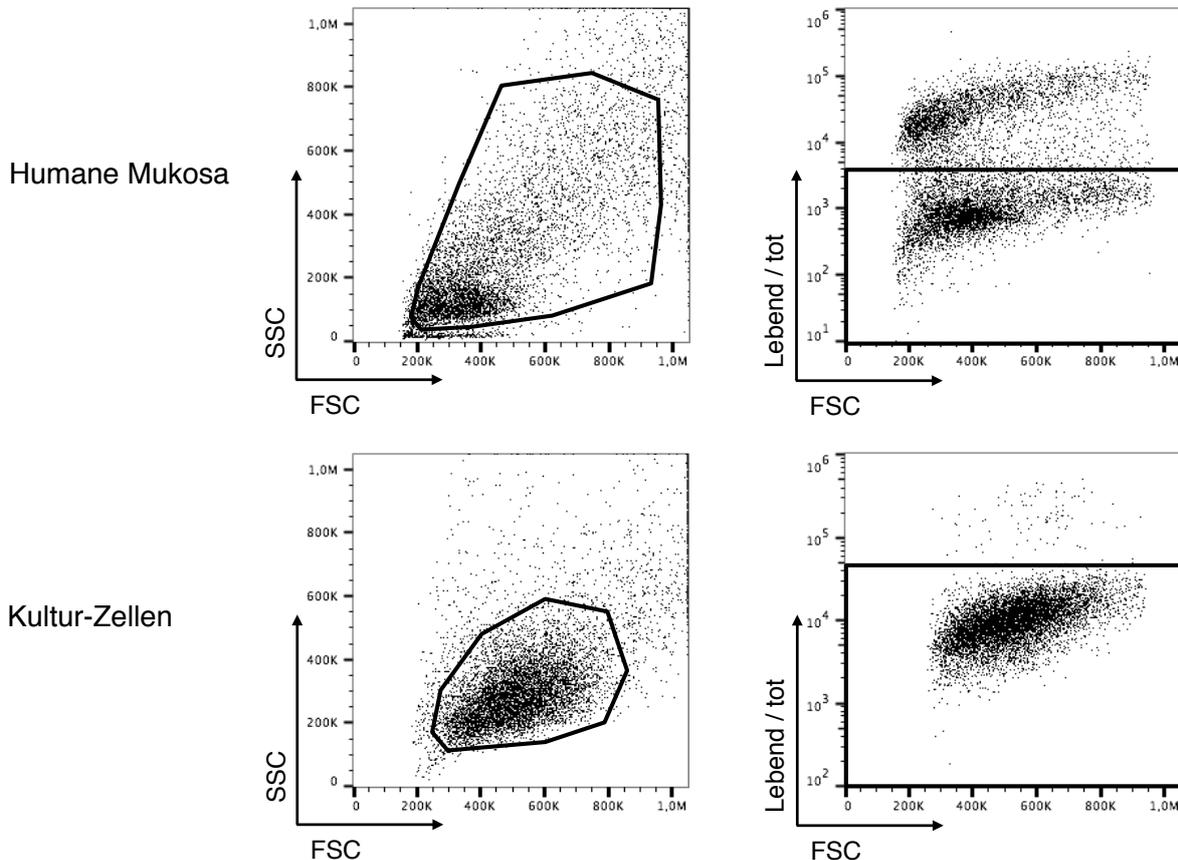


Abb. 6. Definierung der intakten, lebenden Zellen in der Durchflusszytometrie.

Debris und Zellkonglomerate wurden anhand der Eigenschaften im Vorwärtstreulicht (engl. forward scatter (FSC)) und Seitwärtstreulicht (engl. side scatter (SSC)) ausgeschlossen. Tote Zellen wurden mit einem „fixable viability dye“ markiert, wenn sie anschließend fixiert wurden, ansonsten erfolgte die lebend/tot-Färbung mit PI. Exemplarische Darstellung für humane Mukosa und Kultur-Zellen.

Die Färbung der humanen Darmzellen für die Zellsortierung mittels FACS entsprach der an erster Stelle beschriebenen Oberflächenfärbung mit dem Unterschied, dass sie aufgrund der höheren Anzahl eingesetzter Zellen in 1 ml Färbevolumen durchgeführt wurde. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 1:40 eingesetzt, mit Ausnahme von Anti-HLA-DR-PE (1:100). Die Färbung toter Zellen erfolgte mit PI.

Die Zellseparierung erfolgte durch einen FACSAria III (10 Farben, 4 Laser) von BD Biosciences (San José, USA).

Die einzelnen Zellpopulationen wurden in zuvor über Nacht mit FCS beschichteten Reagenzgläsern in DC-Vollmedium aufgefangen, um das Überleben während des Sortierungs-Vorganges zu verbessern. Anschließend wurden sie abzentrifugiert (450 g, 5 min, 4 °C) und in 250 µl TRIzol aufgenommen. Dann erfolgte die RNA-Isolation wie oben beschrieben.

2.3.3 Zellisolation und Zellkultur

Isolation von Einzelzellen aus humaner Mukosa

Zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension aus der Darmschleimhaut wurde die abpräparierte Mukosa der Operations-Präparate in kleine Stücke zerschnitten, mit 30 ml RPMI-Medium, 0,5 mg/ml Collagenase D und 0,1 mg/ml DNase I vermischt und 45 min bei 37 °C unter ständigem Rühren mittels Magnetrührplatte inkubiert. Anschließend wurden die Gewebefragmente durch ein 100 µm Zellsieb gepresst und die erhaltene Zellsuspension bei Raumtemperatur und 450 g für 5 min abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen (30 ml PBS, 450 g, 5 min, 4 °C) erfolgte eine erneute Filterung durch einen 50 µm Nylon-Filter. Nach Zentrifugation (450 g, 5 min, 4 °C) wurde das Zellpellet in Gefriermedium aufgenommen (bis zu 10^7 Zellen pro ml). Die Zellen wurden zunächst über Nacht bei -80 °C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zellkultur

Die *in vitro* Versuche wurden an von Monozyten abgeleiteten DC (Mono-DC) durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial für die Generation der Mono-DC dienten Buffy-Coats, die vom Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes (Institut München, D) bezogen wurden. Zunächst wurden aus dem Buffy-Coat PBMC isoliert. Dazu wurde dieser 1:1 mit PBS-Lösung verdünnt und 25 ml des Gemisches auf 15 ml Biocoll durch langsames pipettieren aufgetragen. Durch Zentrifugieren (20 min bei 900 g und RT mit niedrigster Beschleunigung und ohne Bremse) wurde eine Phasenauffrennung erreicht und die PBMC konnten mit der Pipette aus der Interphase zwischen Plasma und Biocoll abgenommen werden. Die Zellen wurden zweimal in 30 ml PBS-Lösung gewaschen und bei Bedarf wurde eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt (5 min Inkubation mit 10 ml „red blood cell lysing buffer“ bei RT).

Als nächster Schritt wurden die Monozyten mittels MACS aus den PBMC separiert. Dazu wurden humane CD14 „microbeads“ und „LS-Columns“ von Miltenyi (Bergisch Gladbach, D) verwendet. Das Vorgehen erfolgte nach dem vom Hersteller gestellten Protokoll. Zusammengefasst wurden die PBMC in MACS-Puffer (80 μ l pro 10^7 Zellen) mit CD14 microbeads (20 μ l pro 10^7 Zellen) gründlich vermischt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Im magnetischen Feld wurden die gewaschenen Zellen auf die Separationssäule aufgetragen und die Säule mehrfach mit MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde sie aus dem Magnetfeld entfernt und die Antikörper-markierten, CD14 positiven Zellen mit MACS-Puffer aus der Säule gespült.

Die Reinheit der so isolierten Population wurde durchflusszytometrisch bestimmt und lag stets bei über 90 % CD14⁺ Zellen.

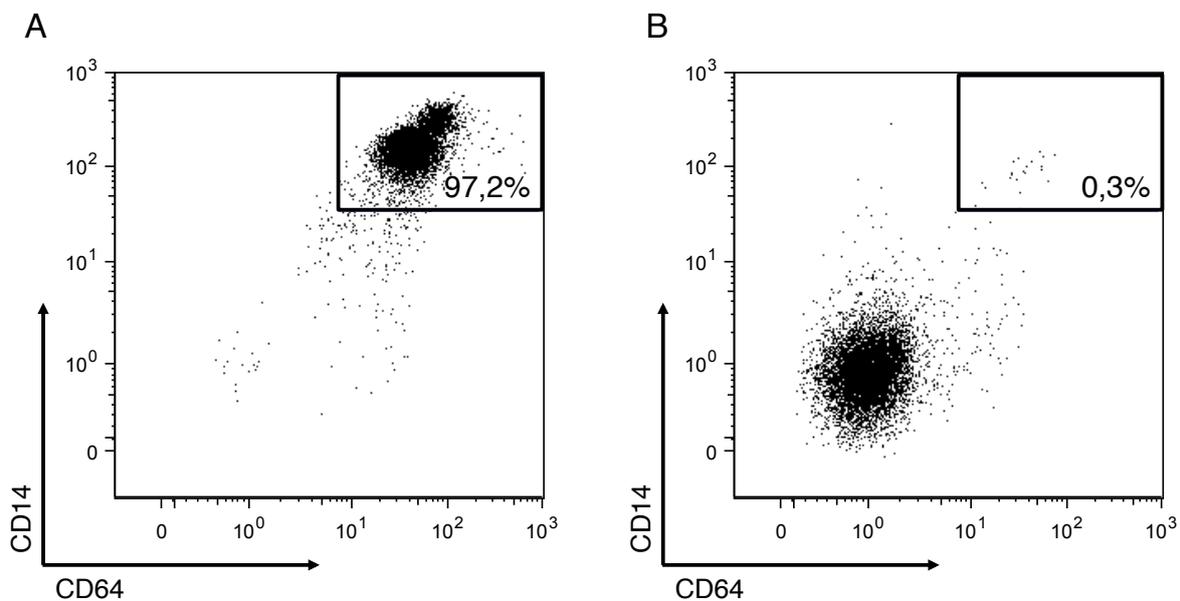


Abb. 7. Reinheit der Monozyten nach MACS.

Die mittels MACS isolierten Monozyten (**A**) und die nach der Separation übrigen Zellen (**B**) wurden auf CD14 und CD64 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Exemplarische Darstellung.

Die Monozyten wurden je nach Versuch in einer 6-Loch oder 24-Loch Flachbodenplatte in DC-Vollmedium mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ bis 10^6 Zellen pro ml ausplattiert. Um die Differenzierung zu DC zu induzieren wurden dem Medium 50 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 zugesetzt. Am vierten Tag der Kultur wurden erneut 25 ng/ml GM-CSF hinzugefügt. Nach 6 – 7 Tagen war die Ausdifferenzierung zu DC zu beobachten und die Zellen wurden ihren jeweiligen experimentellen

Konditionen zugeführt. Dazu wurden die Zellen aus dem 6-Loch-Format an Tag 6 in eine 96-Loch-Platte überführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C mit 5 % CO₂.

2.3.4 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Der ELISA wurde in Sandwich-Form zur Detektion von Zytokinkonzentrationen in Kultur-Überständen und zur Bestimmung des CCL17-Serumspiegels von Patienten angewendet.

Zur Durchführung wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Der „Capture Antibody“ wurde in PBS-Lösung auf seine Endkonzentration verdünnt, eine 96-Loch Flachbodenplatte mit je 100 µl davon bedeckt und über Nacht inkubiert. Die gesamte Durchführung erfolgte bei RT. Dann wurde der Inhalt der Platte verworfen und die Vertiefungen dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Am Ende jedes Waschvorgangs wurde die Platte durch festes Aufschlagen auf saubere Papiertücher getrocknet. Anschließend wurde mit je 300 µl „Reagent Diluent“ für zwei Stunden geblockt. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Proben und eine Verdünnungsreihe des Proteinstandards jeweils in Duplikaten aufgetragen. Die Proben wurden dabei je nach erwarteter Zytokinkonzentration pur (humanes Serum) oder in einer Verdünnung von 1:5 bis 1:100 (Kulturüberstände) eingesetzt. Nach zwei Stunden Inkubation und einem weiteren Waschvorgang wurden je 100 µl des in „Reagent Diluent“ verdünnten Detektionsantikörpers hinzugefügt. Anschließend wurde die Platte erneut gewaschen, mit 100 µl Strept-HRP (engl. Streptavidin-horseradish peroxidase) pro Vertiefung versehen und lichtgeschützt für 20 min inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl Substrat-Lösung (1:1 Gemisch aus „Color Reagent A“ und „Color Reagent B“) hinzugefügt und die Platte lichtgeschützt inkubiert. Sobald ein deutlich sichtbarer Farbumschlag zu erkennen war, wurde die Reaktion mit 50 µl 2N H₂SO₄ gestoppt. Die photometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines MultiscanEx Mikrotiterplatten Reader von Thermo LabSystems (Egelsbach, D) bei einer Wellenlänge von 450nm. Eine Wellenlängenkorrektur wurde mit 540 nm durchgeführt. Zum Zweck der quantitativen Auswertung wurde stets eine Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Eichkurve angefertigt. Abb. 8 zeigt exemplarisch die Eichkurven der in dieser Arbeit gemessenen Zytokine. Dabei wurden die vom Hersteller vorgeschlagenen Konzentrationen eingesetzt. Zur

weiteren Berechnung der Endkonzentrationen diente die Ascent Software Version 2.6 von Thermo Scientific (Braunschweig, D).

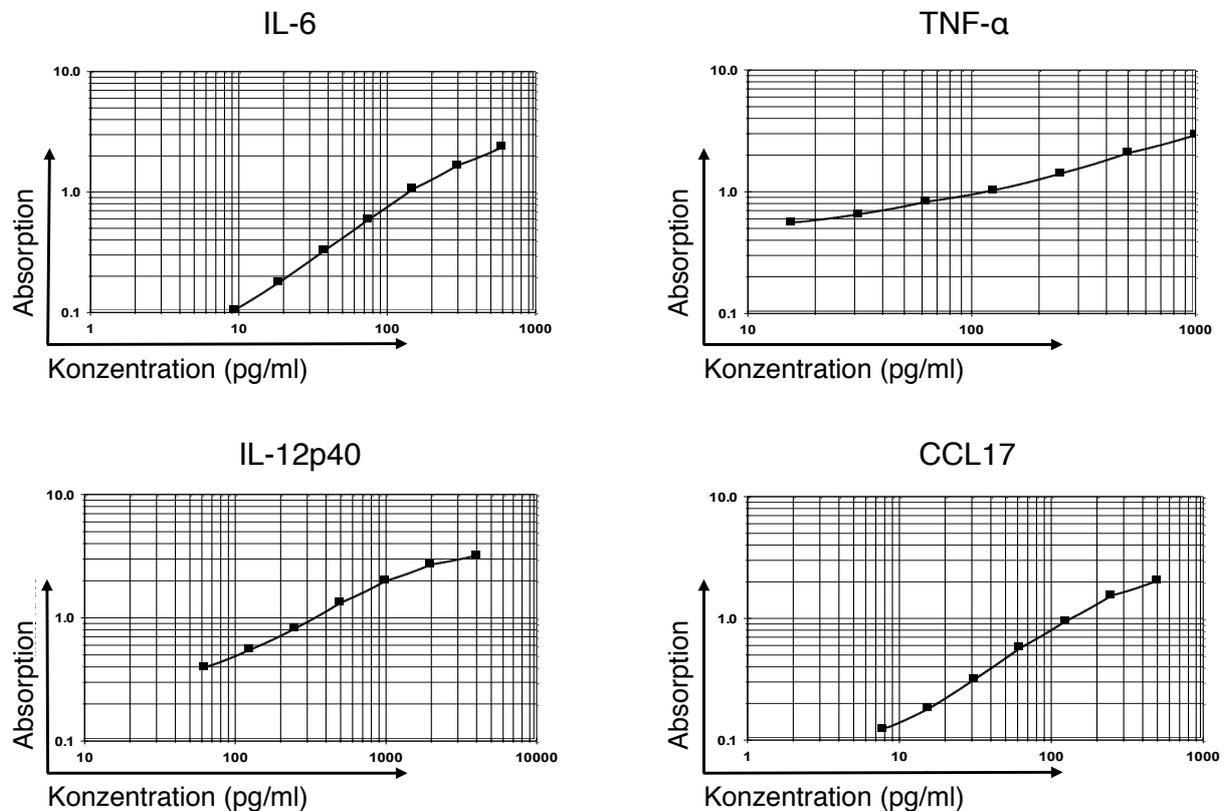


Abb. 8. Standardkurven des ELISA.

Exemplarische Darstellung der Auftragung einer Verdünnungsreihe gegen die photometrisch gemessene Absorption als Grundlage für die Berechnung der Proben-Konzentrationen im ELISA für IL-6, TNF- α , IL-12p40 und CCL17.

2.3.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden mit Hilfe der GraphPad Prism Software statistisch analysiert. Dazu wurden die $\Delta\Delta C_t$ -Werte verwendet, da diese einer Gaußschen Normalverteilung folgen, was mittels D'Agostino-Pearson-Test bestätigt wurde. Lediglich in einer Gruppe (Expression von Foxp3 im entzündeten Ileum von MC Patienten) konnte die Normalverteilung erst nach Ausschluss eines Ausreißers nachgewiesen werden. Die drei Gruppen, die miteinander verglichen wurden, nämlich „gesunde Kontrollgruppe“, „nicht entzündetes Gewebe von CED Patienten“ und „entzündetes Gewebe von CED Patienten“, wurden zunächst als unabhängige Stichproben betrachtet und mittels ungepaarten t-Tests nach Student verglichen. Der

Vergleich zwischen entzündetem und nicht entzündetem Gewebe von jeweils gleichen Individuen wurde mit gepaartem t-Test nach Student durchgeführt.

Wenn innerhalb gleichbleibender Datensätze mehrere Gruppen untereinander verglichen wurden, wurde die Bonferroni-Korrektur für multiples Testen angewendet, um das durch mehrfaches Testen steigende Risiko falsch positiver Ergebnisse auszugleichen. Diese besagt: Wenn statistische Signifikanz bei einem P-Wert $< x$ angenommen werden soll, muss der P-Wert jedes einzelnen Tests x/n unterschreiten, wobei n die Anzahl der durchgeführten Tests ist (Motulsky 2013). In dieser Arbeit wurden innerhalb eines Datensatzes je drei Tests durchgeführt (gesundes vs. entzündetes Gewebe, gesundes vs. nicht entzündetes Gewebe von CED Patienten und nicht entzündetes CED-Gewebe vs. entzündetes Gewebe). Da als globales Signifikanz-Niveau ein P-Wert $< 0,05$ festgelegt wurde, wurden Ergebnisse einzelner Tests ab einem P-Wert $< 0,0167$ ($0,05/3$) als signifikant betrachtet. Sofern nicht anders angegeben wurde in der deskriptiven Statistik jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) als Maß für die Streuung in den einzelnen Stichproben dargestellt.

Weiterhin wurde die Expression der hier untersuchten Gene auf Korrelation überprüft. Der Korrelationskoeffizient r steht dabei für die Stärke der Korrelation. Er kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen, wobei ein Wert von plus bzw. minus 1 einen vollständigen positiven bzw. negativen linearen Zusammenhang anzeigt. Ist der Wert gleich 0 , besteht keine lineare Korrelation. Der P-Wert gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit an. Ergebnisse mit $P < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von Chemokinen und Zytokinen in der Mukosa von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

Eine verstärkte Expression von CCL17 in der Darmmukosa von Patienten mit CED wurde bereits mehrfach postuliert (Jugde, Alizadeh et al. 2001, Autschbach, Giese et al. 2002, Christophi, Rong et al. 2012). Es wurde gezeigt, dass besonders im entzündeten Darm die mRNA-Transkription von CCL17 gesteigert ist. Daten darüber, bei welcher CED-Entität dieser Effekt vorrangig auftritt und welche Stellung der nicht entzündete Darm von CED-Patienten einnimmt, sind jedoch bislang nicht schlüssig.

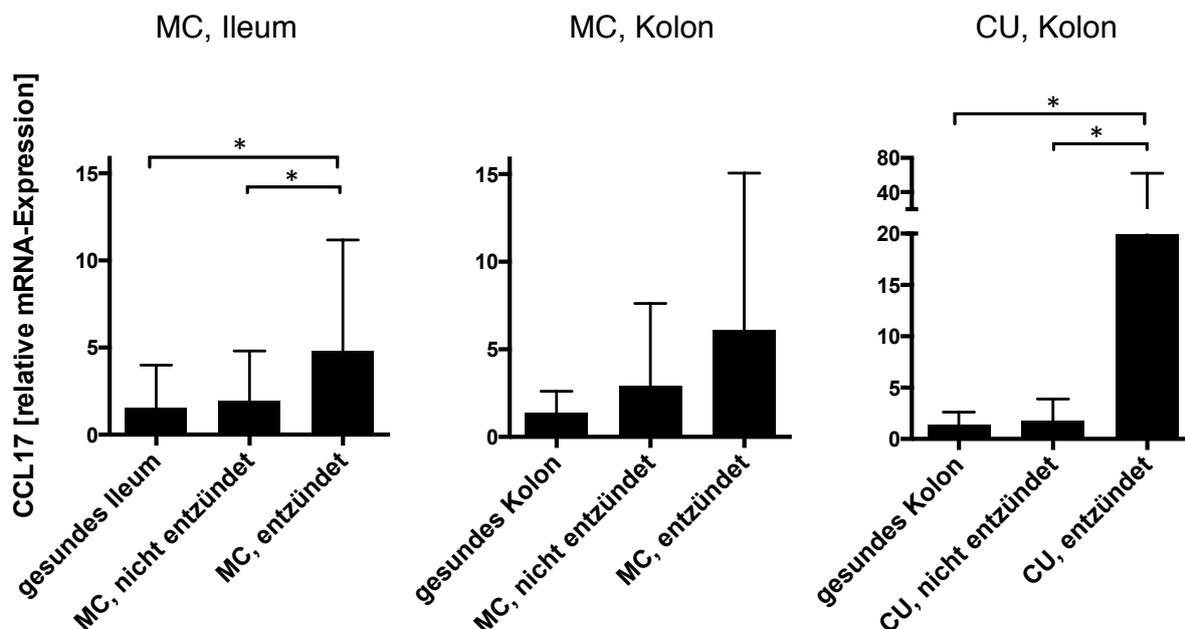


Abb. 9. Relative mRNA-Expression von CCL17 bei Patienten mit CED verglichen mit gesunden Kontrollen.

Die Extraktion der mRNA aus intestinaler Mukosa, Durchführung der qRT-PCR und Auswertung mithilfe eines Kalibrators wurden durchgeführt wie in Methoden 2.3.1 beschrieben. Es werden jeweils Proben aus entzündetem und nicht entzündetem Gewebe aus dem Ileum von MC Patienten (nicht entzündet: n = 25; entzündet: n = 30), dem Kolon von MC Patienten (nicht entzündet: n = 28; entzündet: n = 16) und dem Kolon von Patienten mit CU (nicht entzündet: n = 19; entzündet: n = 17) mit einer gesunden Kontrollgruppe aus Ileum (n = 17) oder Kolon (n = 16) verglichen. Die Graphen zeigen Mittelwert und SD, Sternchen stehen für statistische Signifikanz (t-Test nach Student, globales Signifikanzniveau $P < 0,05$, Korrektur nach Bonferroni, siehe Methoden 2.3.5)

In der vorliegenden Arbeit wurde Dün- und Dickdarmschleimhaut von Patienten mit MC und CU auf ihren CCL17-mRNA-Gehalt untersucht und mit gesunder Mukosa verglichen. Die Verhältnisse wurden dabei jeweils für Dünndarm von MC Patienten, Dickdarm von MC Patienten und Dickdarm von CU Patienten gesondert betrachtet. In allen drei Gruppen zeigte sich eine stärkere Expression von CCL17 im entzündeten Gewebe gegenüber nicht entzündeter und gesunder Schleimhaut. Im Ileum von MC Patienten und im Kolon von CU Patienten erreichte der Unterschied statistische Signifikanz. In der nicht entzündeten Mukosa der CED Patienten war die Expression jeweils nur geringfügig und nicht signifikant erhöht.

Entscheidend für eine gesteigerte CCL17-Transkription scheint also das Vorliegen einer aktiven Entzündung zu sein. Abb. 10 zeigt die Expressionsmuster innerhalb einzelner Individuen. Hier wird Gewebe aus entzündeten und nicht entzündeten Darmabschnitten derselben Patienten verglichen.

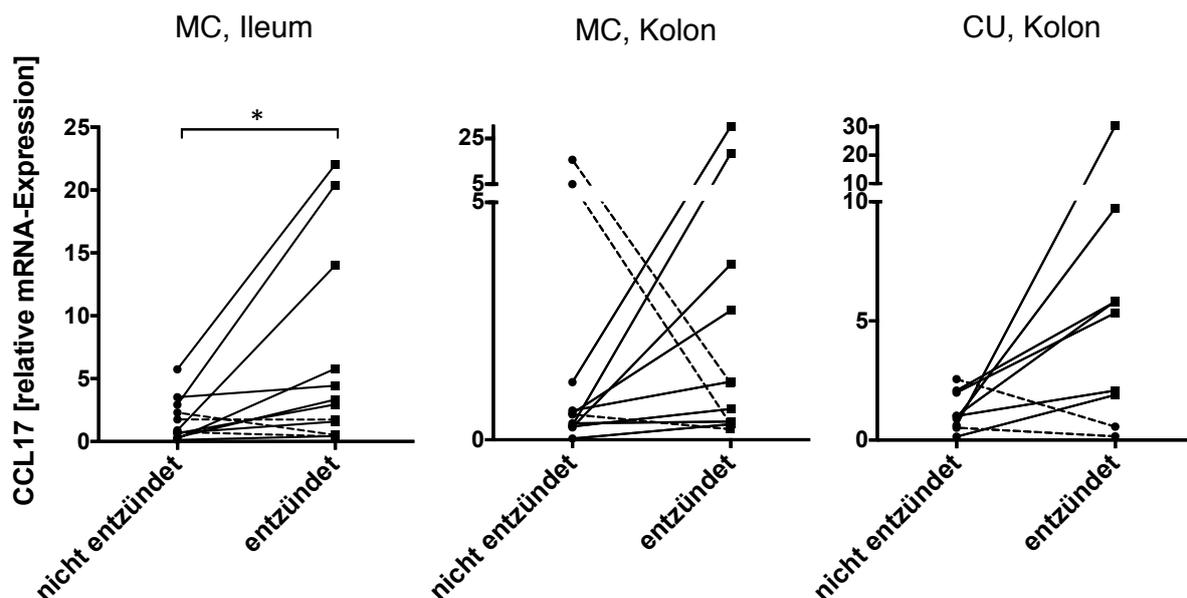


Abb. 10. Gegenüberstellung der mRNA-Expression von CCL17 in entzündeten und nicht entzündeten Darmabschnitten gleicher Individuen.

Es wird jeweils gesondert verglichen im Ileum ($n = 12$) und Kolon ($n = 11$) von Patienten mit MC und Kolon von Patienten mit CU ($n = 9$). Die Linien zeigen, welche Werte von dem gleichen Spender stammen. Durchgezogene Linien kennzeichnen eine stärkere Expression im entzündeten Gewebe, gestrichelte Linien stehen für eine geringere Expression im entzündeten Darmabschnitt. Statistische Signifikanz wird durch das Sternchen angezeigt (gepaarter t-Test, $P < 0,05$).

Bei den meisten Patienten zeigte sich eine stärkere Expression von CCL17 im entzündeten Gewebe. Doch im Ileum bei 3 von 12 Individuen und im Kolon bei 3 von 11 Patienten mit MC und bei 2 von 9 CU Patienten war eine teilweise geringfügig, teilweise deutlich stärkere Expression im nicht entzündeten Darm zu beobachten. Eine Steigerung der CCL17-Produktion bei Entzündungsaktivität lässt sich somit für die Mehrheit der Patienten, jedoch nicht für alle Patienten annehmen.

Das in dieser Studie gewonnene Patientenmaterial wurde weiterhin auf die mRNA-Expression von CCL22, Foxp3 und IL-17A untersucht.

CCL22 ist das mit CCL17 am engsten verwandte Chemokin. Es bindet am gleichen Rezeptor, CCR4, und ist bei vielen autoimmunologischen Erkrankungen analog zu CCL17 in gesteigertem Maße vorhanden (Gonzalo, Pan et al. 1999, Jugde, Alizadeh et al. 2001, Nakazato, Kishida et al. 2008).

Foxp3 ist ein für die Funktion regulatorischer T-Zellen essentieller Transkriptionsfaktor und ein charakteristisches Merkmal dieser Zellen (Fontenot, Gavin et al. 2003, Hori, Nomura et al. 2003, Fontenot, Rasmussen et al. 2005). Auch die Expression von Foxp3 ist in entzündetem Gewebe von CED Patienten verstärkt (Christophi, Rong et al. 2012), doch wird ein protektiver Effekt Foxp3-positiver T-Zellen angenommen (Gad 2005, Uhlig, Coombes et al. 2006). Heiseke et al. zeigten im experimentellen Kolitis-Modell der Maus, dass ein langfristig protektiver Effekt der Abwesenheit von CCL17 auf die Entzündungsentwicklung durch Foxp3⁺ Treg vermittelt wird (Heiseke, Faul et al. 2012).

IL-17A ist als Bestandteil der mukosalen Barrierefunktion und Induktor inflammatorischer Signalwege bekannt (Kolls and Linden 2004, Curtis and Way 2009). Zwar wird der Th17/IL-17A-Axe eine Rolle bei der CED Entstehung zugeschrieben, doch gibt es auch Hinweise auf einen protektiven Effekt von IL-17A im Kontext von CED (Liu, Yadav et al. 2009, O'Connor, Zenewicz et al. 2010, Targan, Feagan et al. 2016). Im Mausmodell führte ein genetischer CCL17-Knockout zu einer verminderten IL-17-mRNA-Expression und geringeren Fraktion von Th17-Zellen im Darm und in der Milz nach Induktion einer experimentellen Kolitis und CCL17-defiziente DC zeigten *in vitro* ein geringeres Potential T-Zellen zur Produktion von IL-17 anzuregen als Wiltpy-DC (Heiseke, Faul et al. 2012).

In dieser Studie wurden die Expressionsmuster der drei genannten Marker im Darm von CED Patienten untersucht, um sie anhand des einheitlichen Patientenmaterials im Zusammenhang mit CCL17 betrachten zu können.

CCL22 zeigte analog zu CCL17 eine verstärkte mRNA-Expression in der entzündeten Schleimhaut, sowohl im Ileum und Kolon von MC Patienten als auch im Kolon von CU Patienten, gegenüber gesundem Kontrollgewebe und nicht entzündetem Gewebe. Dieses wies im Vergleich zur Kontrolle nur eine geringfügig stärkere Expression auf. Insgesamt fiel die Expressionsinduktion im Vergleich zu CCL17 geringer aus, sodass keine statistische Signifikanz erreicht wurde.

Bei Foxp3 und IL-17A zeigte sich in allen drei Gruppen eine signifikant stärkere Expression im entzündeten Gewebe gegenüber gesunder Mukosa. Auch hier nahm das nicht entzündete Gewebe der CED Patienten eine Zwischenstellung zwischen gesunder und entzündeter Schleimhaut ein, lag aber in den meisten Fällen näher an der gesunden Kontrollgruppe. Eine Ausnahme stellte das Ileum von MC Patienten dar. Hier wies die nicht entzündete Mukosa eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere Expression von IL-17A auf.

Insgesamt war bei IL-17A die quantitativ stärkste mRNA-Induktion zu beobachten.

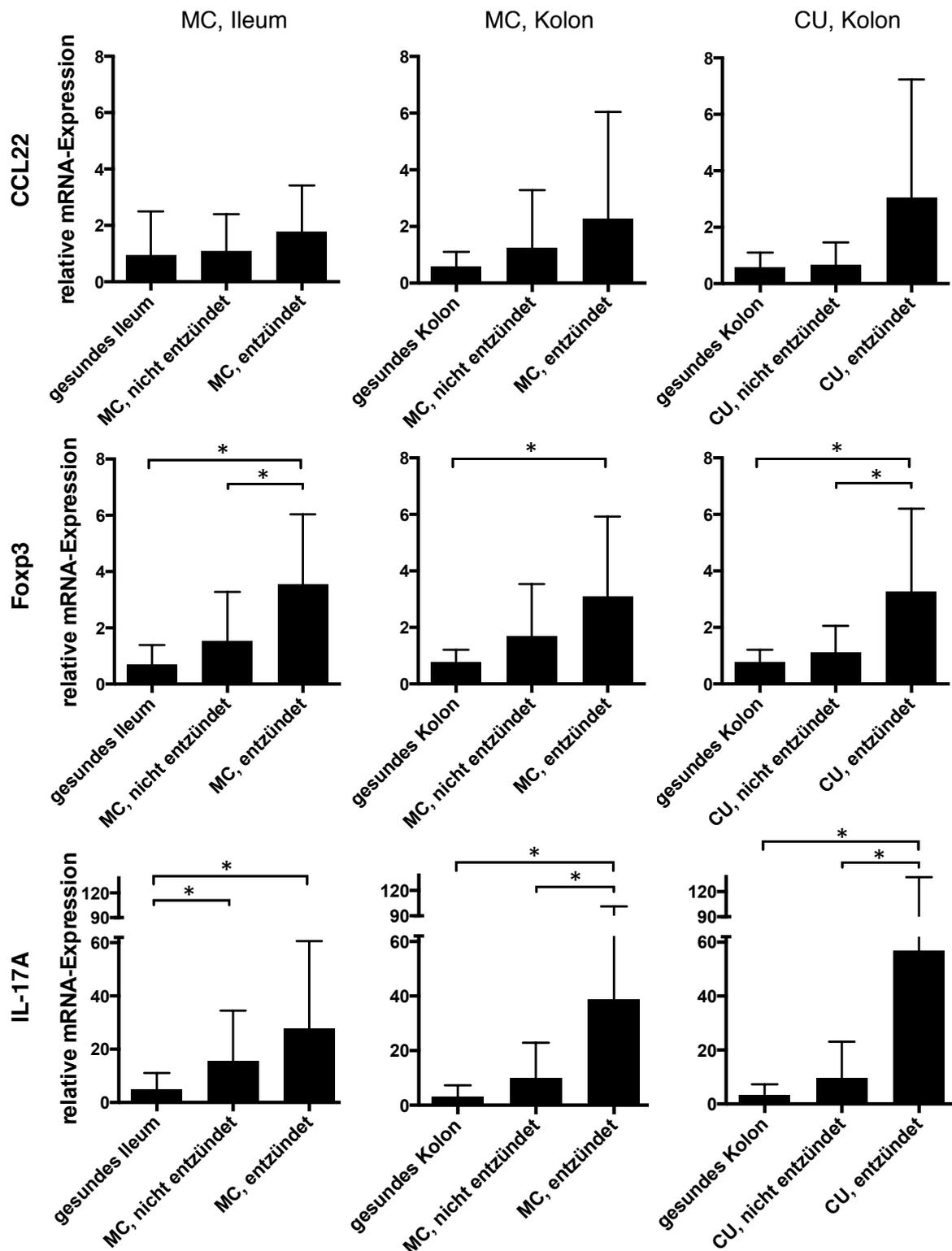


Abb. 11. mRNA-Expression von CCL22, Foxp3 und IL-17A im Ileum und Kolon von Patienten mit MC und Kolon von Patienten mit CU.

Die Extraktion der mRNA aus intestinaler Mukosa, Durchführung der qRT-PCR und Auswertung mithilfe eines Kalibrators wurden durchgeführt wie in Methoden 2.3.1 beschrieben. Es wurde jeweils entzündetes und nicht entzündetes Gewebe mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Die Graphen zeigen Mittelwert und SD, Sternchen stehen für statistische Signifikanz (t-Test nach Student, globales Signifikanzniveau $P < 0,05$, Korrektur nach Bonferroni, siehe Methoden 2.3.5)

Nun stellt sich die Frage, ob CCL17 und CCL22 im Kontext von CED synergistisch wirken und den gleichen Stimuli unterliegen und ob die Rekrutierung und Differenzierung von Foxp3⁺ T-Zellen und Th17-Zellen von CCL17 beeinflusst wird.

Um Hinweise auf mögliche Zusammenhänge zu gewinnen, wurde eine Korrelationsanalyse von CCL17 mit CCL22, Foxp3 und IL-17A durchgeführt. Diese soll zeigen, ob die Expression von CCL17 und CCL22 ähnlich reguliert ist und inwiefern die Expression von CCL17 mit der Expression von Foxp3 und IL-17A als Marker für Treg und Th17-Zellen korreliert. Abb. 12 stellt diese Analyse graphisch dar.

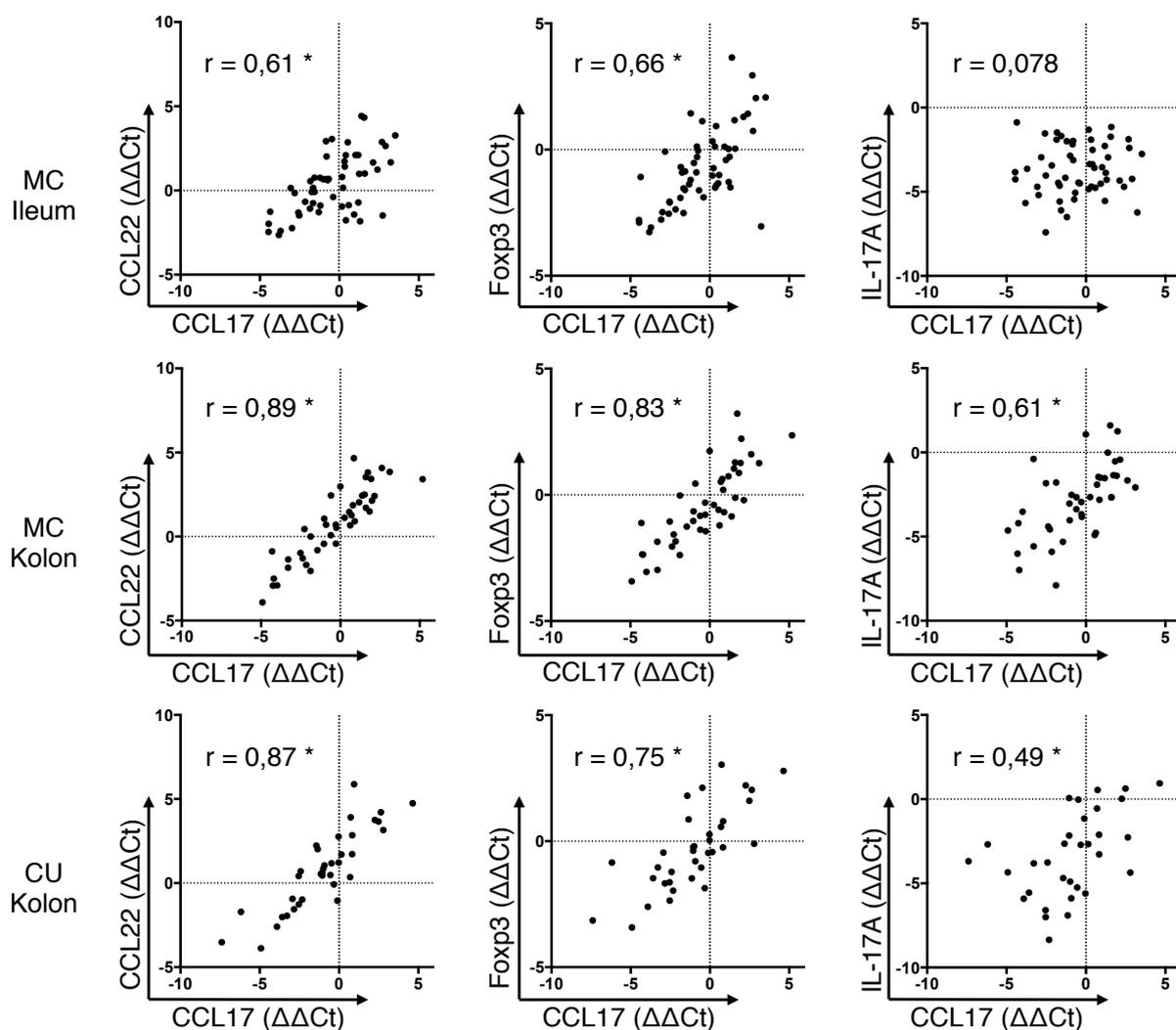


Abb. 12. Korrelation von CCL17 mit CCL22, Foxp3 und IL-17A.

Dargestellt ist die Auftragung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte von CCL17 gegen die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte von CCL22, Foxp3 und IL-17A jeweils für Ileum und Kolon von MC Patienten und Kolon von CU Patienten. Mit abgebildet ist der Korrelationskoeffizient r , ein Sternchen zeigt statistische Signifikanz an ($P < 0,05$).

Zur Veranschaulichung wurden hier die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte gewählt, da diese einer Normalverteilung folgen (siehe Methoden 2.3.5). Da es hier weniger um den Vergleich von entzündetem und nicht entzündetem Gewebe, sondern um den Zusammenhang der Expression der untersuchten Marker mit der von CCL17 geht, wurden hier die Ergebnisse aus den jeweiligen Kategorien „Ileum von MC Patienten“, „Kolon von MC Patienten“ und „Kolon von Patienten mit CU“ gemeinsam betrachtet.

Es ergab sich eine signifikante Korrelation von CCL17 mit CCL22 und Foxp3 im Ileum und Kolon von Patienten mit MC und Kolon von Patienten mit CU. Besonders stark war diese jeweils im Kolon ausgeprägt.

Interessanterweise korrelierte IL-17A nur im Kolon von MC und CU Patienten mit CCL17. Im Ileum von MC Patienten hingegen zeigte die Korrelationsanalyse, dass ein Zusammenhang sehr unwahrscheinlich erscheint.

Auch für die gesunden Kontrollgruppen wurde die Analyse durchgeführt. Aufgrund der geringeren Stichprobenanzahl sind die Ergebnisse dieser Gruppen weniger aussagekräftig und nicht abgebildet. Im gesunden Ileum und Kolon zeigte sich ebenfalls eine signifikante Korrelation der Expression von CCL17 mit der Expression von CCL22 und Foxp3. Die Expression von IL-17A hingegen korrelierte nicht signifikant mit der von CCL17 im gesunden Darmgewebe (Tab. 1).

CCL22	MC, Ileum	MC, Kolon	CU, Kolon	Ileum, gesund	Kolon, gesund
r	0,61	0,89	0,87	0,59	0,78
P	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
n	55	43	36	17	15
Foxp3					
r	0,66	0,83	0,75	0,64	0,53
P	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
n	55	43	35	17	15
IL-17A					
r	0,078	0,61	0,49	-0,26	0,36
P	0,57	< 0,05	< 0,05	0,35	0,2
n	55	42	32	15	14

Tab. 1. Statistische Auswertung der Korrelation der Expression von CCL17 mit der Expression von CCL22, Foxp3 und IL-17A.

Gezeigt sind der Korrelationskoeffizient r, der Signifikanzwert P und die Anzahl n der jeweiligen Wertepaare.

Zusammengefasst ergab sich eine stärkere Beziehung von CCL17 zu CCL22 und Foxp3 als zu IL-17A. Besonders hervorzuheben ist die Beobachtung, dass bei Patienten mit MC eine signifikante Korrelation von CCL17 und IL-17A im Kolon bestand, während im Ileum kein Zusammenhang nachgewiesen werden konnte.

3.2 CCL17-Serumspiegel von Patienten mit CED

Erhöhte Serumspiegel von CCL17 sind bereits bei anderen entzündlichen Erkrankungen beschrieben worden (Sekiya, Yamada et al. 2002, Fujisawa, Nagao et al. 2009, Miyazaki, Unoura et al. 2013, Ogawa, Morito et al. 2014, Lu, Jiao et al. 2016). Bei Patienten mit atopischer Dermatitis korreliert CCL17 im Serum so gut mit dem Ausprägungsgrad der Krankheit, dass es als Aktivitätsparameter herangezogen wird (Kataoka 2014). Über die Bedeutung des CCL17-Wertes im Serum von Patienten mit CED ist bislang wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurden die Seren von 16 Patienten mit MC und 19 Patienten mit CU mittels ELISA auf ihren CCL17-Spiegel untersucht und mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen.

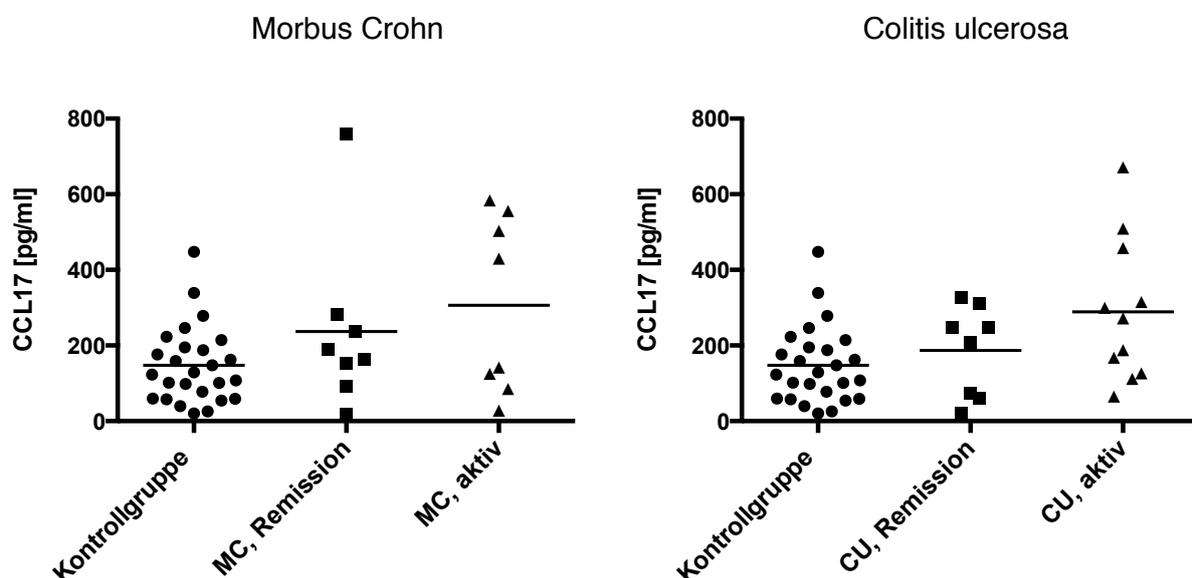


Abb. 13. Serumspiegel von CCL17.

Die Konzentration von CCL17 im Serum wurde mittels ELISA gemessen. Patienten mit MC oder CU wurden jeweils in eine Gruppe mit aktiver Erkrankung und eine Gruppe ohne Krankheitsaktivität eingeteilt. Die horizontalen Linien zeigen jeweils den Mittelwert an. Auf eine statistische Auswertung wurde bei geringer Stichprobenanzahl und nicht gegebener Normalverteilung der Datensätze verzichtet.

Sowohl bei MC als auch bei CU zeigte sich in der Gruppe der Patienten mit aktiver Erkrankung die höchste durchschnittliche CCL17-Serumkonzentration. Bei Patienten in Remission lag diese niedriger als bei aktiv Erkrankten, doch etwas höher als in der Kontrollgruppe. Betrachtet man jedoch die Werte im Einzelnen, lässt sich eine breite Streuung feststellen. Nur etwa die Hälfte aller CED Patienten weist erhöhte CCL17-Serumspiegel auf, während die andere Hälfte Werte im durchschnittlichen Bereich der Kontrollgruppe oder sogar darunter zeigt. Somit erweist sich die Konzentration von CCL17 im Serum als für den einzelnen Patienten wenig aussagekräftig.

3.3 Identifizierung der CCL17-exprimierenden Zellpopulationen im menschlichen Darm

Ein zentrales Thema dieser Arbeit ist die Fragestellung, welche Arten von Zellen in der menschlichen Darmschleimhaut CCL17 produzieren.

Alferink et al. identifizierten eine spezifische DC-Subpopulation als Hauptquelle für CCL17 in Mäusen. Das Vorkommen dieser DC-Population konnte sowohl im Darm als auch in weiteren Grenzflächen-Geweben wie Lunge und Haut mit Hilfe von CCL17-eGFP(engl. enhanced green fluorescent protein)-Reporter-mäusen nachgewiesen werden (Alferink, Lieberam et al. 2003).

Während bei der Erstbeschreibung des CCL17 im menschlichen Organismus eine konstante Expression lediglich in Thymozyten angenommen wurde (Imai, Yoshida et al. 1996), konnte später gezeigt werden, dass CCL17 auch von „myeloiden“ DC im peripheren Blut konstitutiv exprimiert wird (Penna, Vulcano et al. 2002). Weiterhin wurden auch Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und Keratinozyten unter pathologischen Bedingungen oder nach Stimulation als Quellen für CCL17 identifiziert (Vestergaard, Bang et al. 2000, Lin, Nonoyama et al. 2003, Staples, Hinks et al. 2012, Achuthan, Cook et al. 2016). Welche Zellen jedoch in der Mukosa des menschlichen Darms CCL17 sezernieren, ist bislang nicht beschrieben worden.

3.3.1 Etablierung eines Protokolls zum Nachweis von intrazellulärem CCL17 mittels Durchflusszytometrie

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Durchflusszytometrie-Protokoll erarbeitet, welches mittels Oberflächenfärbung die Differenzierung verschiedener Leukozyten-Populationen aus humaner Darm-Mukosa ermöglicht und in Kombination mit der

intrazellulären Färbung von CCL17 Rückschlüsse auf dessen Hauptproduzenten zulässt.

Zur intrazellulären Färbung von CCL17 stand ein PE-markierter Antikörper zur Verfügung. Zunächst wurden die idealen Versuchsbedingungen bezüglich Inkubationszeit und -temperatur ermittelt. Eine verlängerte Präpermeabilisierung der Zellen vor der Intrazellulärfärbung erbrachte keinen Vorteil. Die Bedingungen, die das stärkste Fluoreszenz-Signal ergaben, wurden ausgewählt (s. Methoden 2.3.2).

Bereits die ersten Versuche zeigten, dass die CCL17-Färbung keine eindeutige Auftrennung in eine positive und eine negative Population ergibt, sondern vielmehr ein diskreter Anstieg der Fluoreszenzintensität gegenüber der Isotypkontrolle in der jeweiligen Population zu erwarten ist. Daher wurde zunächst eine Positivkontrolle für die Färbung von intrazellulärem CCL17 erstellt, um ein genaueres Bild von dem zu erwartenden Signal zu erhalten.

Dazu wurden Mono-DC verwendet. Zu deren Herstellung wurden CD14⁺ Zellen aus dem peripheren Blut mit GM-CSF und IL-4 stimuliert (s. Methoden 2.3.3). Da sowohl GM-CSF als auch IL-4 in der Lage sind, CCL17 in Monozyten zu induzieren (Borriello, Longo et al. 2015, Achuthan, Cook et al. 2016), ist davon auszugehen, dass eine basale CCL17-Expression in Mono-DC zu finden ist. Weiterhin ist LPS als Stimulus für die Expression von CCL17 in DC sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen beschrieben worden (Penna, Vulcano et al. 2002, Alferink, Lieberam et al. 2003).

In dem hier gezeigten Versuch wurden Mono-DC nach ihrer Ausdifferenzierung entweder 20 Stunden lang mit 10 ng/ml LPS stimuliert oder ohne weitere Behandlung belassen. 4 Stunden vor Ablauf der Zeit wurden allen Zellen die Brefeldin A- und Monensin-haltigen Reagenzien GolgiPlug und GolgiStop zugesetzt, um eine Akkumulation des intrazellulären CCL17 zu erreichen. Anschließend erfolgte die Oberflächen- und Intrazellulärfärbung und FACS Analyse wie in Methoden 2.3.2 beschrieben.

Die Mono-DC waren charakterisiert durch eine deutliche Expression von HLA-DR und CD11c. Die Aktivierung der mit LPS stimulierten Zellen war an der starken Hochregulierung der Reifemarker CD83 und CD86 zu erkennen. Die intrazelluläre CCL17-Färbung zeigte ein stärkeres Signal gegenüber der Isotypkontrolle bei nicht

zusätzlich stimulierten bzw. ein deutlich stärkeres Signal bei mit LPS stimulierten Mono-DC, erkennbar an dem Shift der Signalintensität der gesamten Population.

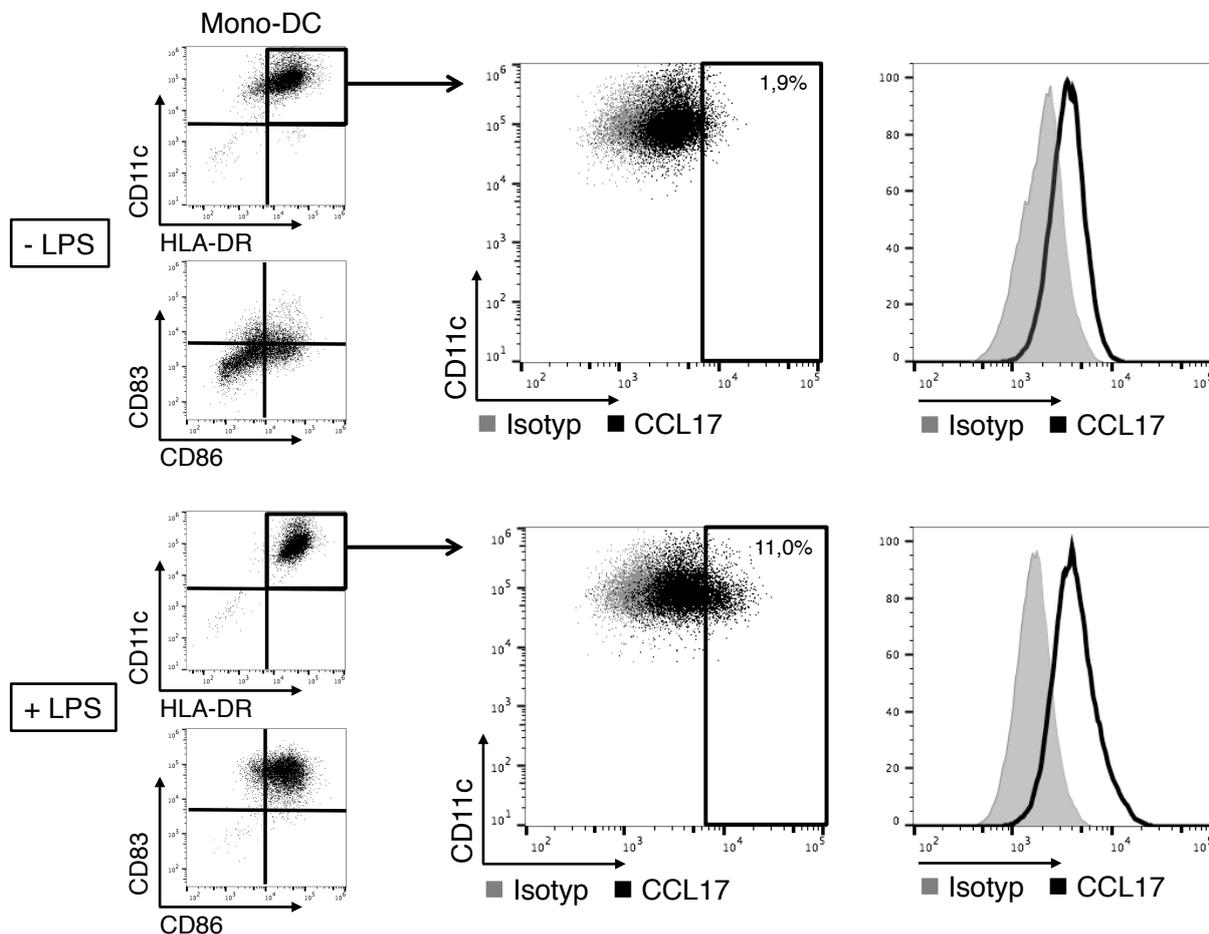


Abb. 14. Durchflusszytometrie mit intrazellulärer Färbung von CCL17 in Mono-DC.

Mono-DC wurden aus Buffy-Coat generiert (s. Methoden 2.3.3), 20 h mit 10 ng/ml LPS stimuliert oder unstimuliert belassen und jeweils 4 h mit GolgiPlug und GolgiStop behandelt.

Anhand dieses Ergebnisses wird deutlich, dass es die hier angewandte Färbung nicht ermöglicht, aus einer Probe humaner Darmzellen die CCL17-positiven Zellen abzugrenzen, um sie dann weiter phänotypisch zu charakterisieren. Stattdessen ist eine Strategie notwendig, die zuerst die unterschiedlichen Zellpopulationen voneinander abgrenzt und schließlich den CCL17-Gehalt jeder Population getrennt betrachtet.

Im Folgenden wurden mukosale Zellen anhand ihrer Oberflächenantigene in fünf Populationen eingeteilt und jeweils mittels Intrazellulärfärbung auf ihren CCL17-Gehalt hin untersucht. Die erste Population (P1) bildeten die CD45-negativen Zellen. Darunter fallen alle Nicht-Immunzellen, wie z.B. Epithelzellen, Stromazellen sowie

endokrine und exokrine Zellen. Die CD45-positiven Zellen wurden anhand ihrer Expression von HLA-DR und den Lineage-Merkmalen (Lin) CD3, CD19, CD20, CD56 weiter unterschieden. Alle Zellen, die weder Lin-Marker noch HLA-DR exprimierten, sind als „sonstige Immunzellen“ (P2) zusammengefasst. Lin beinhaltete CD3, CD19, CD20 und CD56 und identifizierte somit T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen, die als Lymphozyten in Population 3 (P3) zusammen betrachtet werden. Lin-negative und HLA-DR-positive Zellen sind als APC bezeichnet und wurden weiter anhand der Expression von CD14 und CD64 in zwei Populationen unterteilt. Doppelt positive Zellen stellen die Population der Monozyten und Makrophagen (P5) dar, während die doppelt negativen Zellen (P4) die DC beinhalten.

Eine Limitation bei der Analyse des Patientenmaterials ergab sich aus der oft geringen Anzahl CD45-positiver Zellen in den Proben. So wurden nur Proben in die Auswertung mit einbezogen, in denen eine eindeutige Unterscheidung der Immunzellen in P2, P3 und APC möglich war. Die weitere Unterteilung der APC ging in einigen Proben mit geringen Zellzahlen in P4 und P5 einher. Abb. 15 B zeigt exemplarisch die intrazelluläre Färbung von CCL17 in allen 5 hier benannten Populationen in jeweils einer Probe aus dem Kolon und Ileum. In der kollektiven Auswertung der Proben wurden P4 und P5 als APC zusammengefasst betrachtet, um zu geringe Zellzahlen (unter 250 Events) zu vermeiden (Abb. 15 C).

Um eine quantitative Auswertung zu ermöglichen, wurde die Differenz zwischen den medianen Fluoreszenzintensitäten (MFI) der CCL17-Färbung und der jeweiligen Isotypkontrolle gebildet. Das stärkste Signal der CCL17-Färbung zeigte sich in der Gruppe der Nicht-Immunzellen sowie bei den APC. Wenn eine weitere Unterscheidung der APC in P4 und P5 möglich war, wies P4 meist ein intensiveres Signal auf als P5.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass dendritische Zellen sowie Monozyten und Makrophagen, aber evtl. auch Nicht-Immunzellen des Gastrointestinaltraktes als Quelle für CCL17 im menschlichen Darm in Frage kommen.

Um diese These weiter zu untermauern wurde die hier angewandte Methode weiterentwickelt und mit der qRT-PCR zum sensitiveren Nachweis von CCL17 kombiniert, wie im nächsten Abschnitt beschrieben.

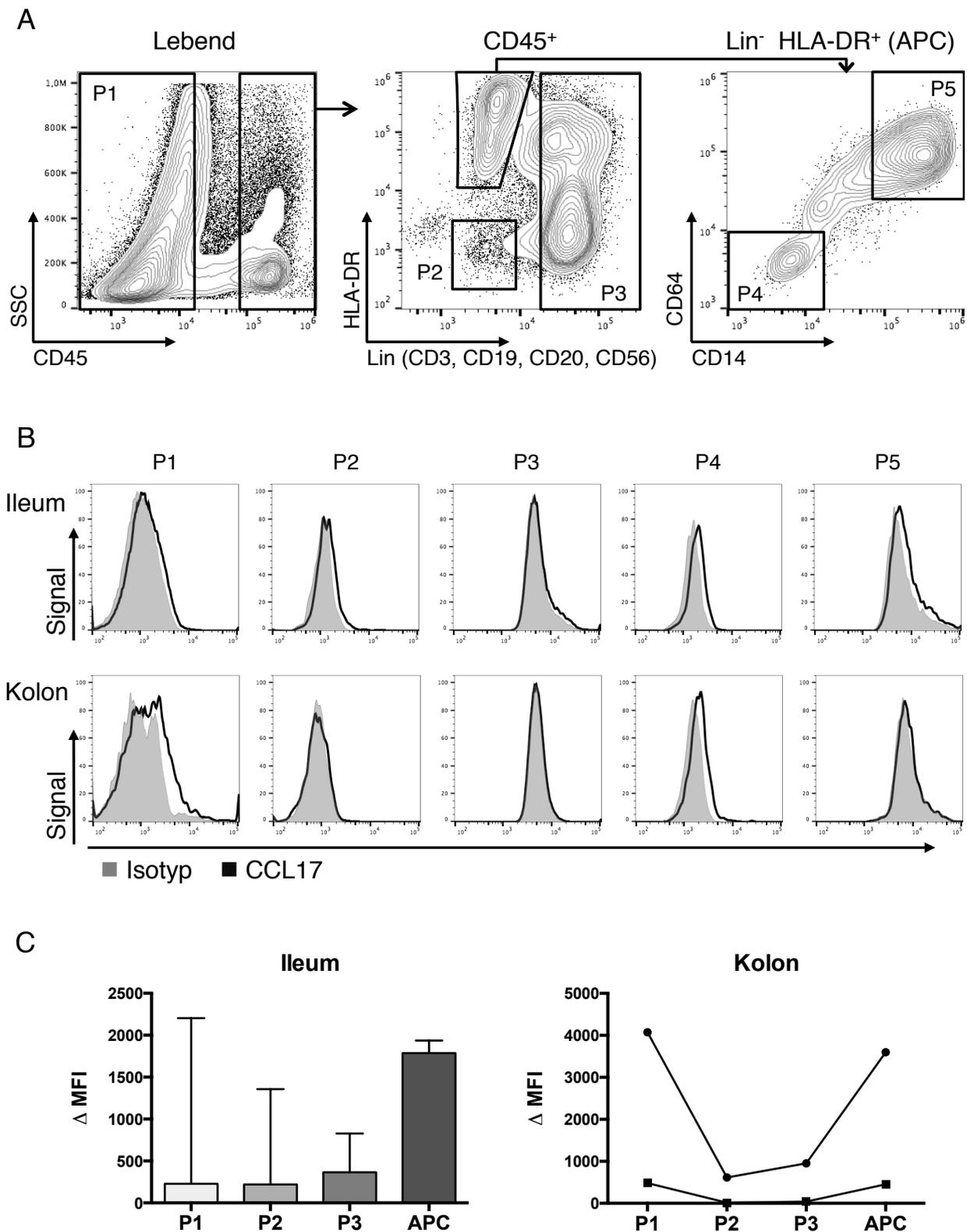


Abb. 15. Intrazellulärfärbung von CCL17 in menschlichen Darmzellen

(A) Aus Fragmenten intestinaler Mukosa wurde eine Einzelzellsuspension gewonnen (s. Methoden 2.3.3) und durchflusszytometrisch in 5 Populationen eingeteilt. (B) Exemplarische Darstellung der intrazellulären CCL17-Färbung in den einzelnen Populationen in entzündetem Ileum und entzündetem Kolon. (C) Differenz der MFI zwischen CCL17 und Isotyp (Δ MFI) in den einzelnen Zellpopulationen im Ileum ($n = 5$) gezeigt als Median mit Range und Kolon ($n = 2$); verbundene Punkte gehören zur gleichen Probe.

3.3.2 Expression von CCL17 in einzelnen Populationen mukosaler Leukozyten

Um der Frage, welche Zellen im menschlichen Darm hauptsächlich CCL17 exprimieren, weiter auf den Grund zu gehen, wurden insgesamt 10 Proben humaner intestinaler Mukosa mittels FACS-Sortierung in einzelne Zellpopulationen aufgetrennt, welche anschließend mithilfe der qRT-PCR auf die Expression von CCL17 untersucht wurden.

Die Einteilung in 5 Populationen erfolgte dabei analog zum oben beschriebenen Vorgehen.

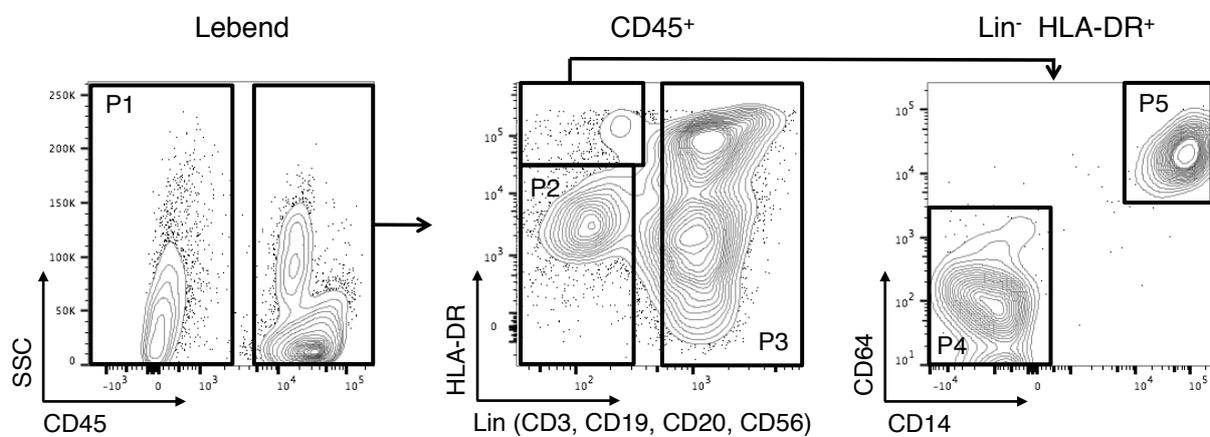


Abb. 16. Sortierung humaner intestinaler Mukosazellen.

Es wurden 5 Populationen aufgetrennt: CD45⁻ (P1), unter CD45⁺: HLA-DR⁻Lin⁻ (P2), Lin⁺ (P3) und unter HLA-DR⁺Lin⁻: CD14⁻CD64⁻ (P4) und CD14⁺CD64⁺ (P5).

Aus den so gesorteten Zellpopulationen wurde mRNA isoliert und mit der qRT-PCR die CCL17-Expression bestimmt. Die Untersuchung wurde an 10 aus OP-Präparaten gewonnenen Proben von 9 Patienten durchgeführt, von denen eine ausreichende Zahl eingefrorener Darmzellen vorhanden war.

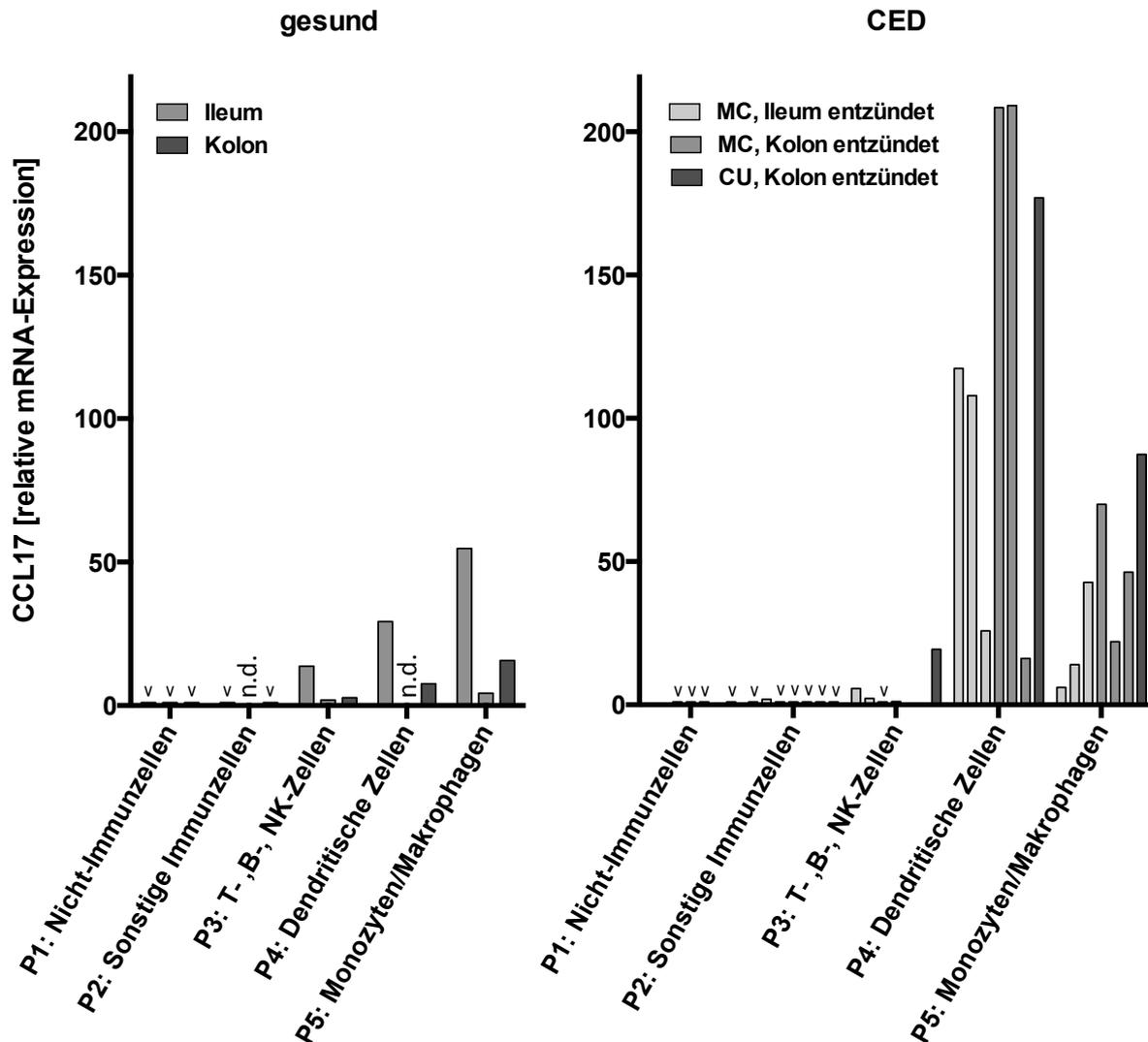


Abb. 17. CCL17-Expression in einzelnen Zellpopulationen der Darm-Mukosa.

Es wurden 5 Populationen (P1-P5) mittels FACS sortiert wie in Abb. 16 dargestellt. Anschließend erfolgte die mRNA-Extraktion, reverse Transkription und qRT-PCR wie in Methoden 2.3.1 beschrieben. Die Ergebnisse von 3 gesunden Probanden, 6 Proben von MC Patienten (jeweils 3 Proben aus Ileum und Kolon) und 1 Patienten mit CU sind abgebildet. In zwei Populationen einer Probe aus gesundem Ileum konnte keine cDNA detektiert werden (n.d.). „v“ kennzeichnet Proben, in denen bei messbarer Expression des internen Referenzgens keine CCL17-cDNA detektiert werden konnte. Auf eine statistische Auswertung wurde verzichtet.

Die stärkste Expression von CCL17 zeigte sich sowohl im Ileum als auch im Kolon in der Population P4, welche die dendritischen Zellen beinhaltet, gefolgt von P5, den Monozyten/Makrophagen. In der Gruppe der T-, B- und NK-Zellen (P3) erwies sich die Expression vergleichsweise niedrig, während bei den Nicht-Immunezellen (P1) und übrigen Immunezellen (P2) meist gar keine CCL17-mRNA detektiert werden konnte. In den Fällen, in denen die qRT-PCR das endogene Kontrollgen nachweisen konnte, für

CCL17 aber negativ blieb, wurde folgendermaßen vorgegangen: Der Ct-Wert für CCL17 wurde gleich 40 gesetzt, da die qRT-PCR in diesem Versuch mit 40 Zyklen durchgeführt wurde und sich dies somit als maximal messbarer Ct-Wert ergibt. Die Expression wurde dann nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode berechnet (s. Methoden 2.3.1). Somit ergab sich ein Wert, den die tatsächliche Expression in der jeweiligen Probe auf jeden Fall unterschreiten musste. Alle so berechneten Werte lagen unter 1, zumeist weit darunter, und sind in Abb.17 mit einem „V“-Symbol gekennzeichnet. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass ein fehlendes Signal für CCL17 in der qRT-PCR tatsächlich auf eine nicht vorhandene oder sehr geringe Expression von CCL17 zurückzuführen ist und nicht lediglich einer zu geringen Menge an eingesetzter cDNA geschuldet ist. Lediglich bei einer Probe waren in zwei Populationen (gesundes Ileum, P2 und P4) sowohl CCL17 als auch die endogene Kontrolle nicht detektierbar (n.d.).

Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass vorwiegend APC (DC und Monozyten/Makrophagen) im menschlichen Darm für die Produktion von CCL17 verantwortlich sind. Die Vermutung, dass auch Nicht-Immunzellen des Gastrointestinaltraktes CCL17 exprimieren, konnte auf Transkriptionsebene nicht bestätigt werden.

Die quantitativ stärkste Expression zeigte sich in DC von Patienten mit aktiver Entzündung. DC von gesunden Spendern wiesen eine deutlich niedrigere CCL17-Expression auf. Um eine definitive Aussage zur Verteilung der Expression von CCL17 auf die einzelnen Leukozyten-Populationen bei gesunden Personen und Patienten mit CED mit oder ohne Erkrankungsaktivität treffen zu können, wäre eine größere Anzahl an Stichproben notwendig.

3.4 Wirkung von CCL17 auf dendritische Zellen

Die CCR4-vermittelte chemotaktische Migration von Effektor-T-Zellen (Imai, Nagira et al. 1999, Lieberam and Forster 1999) ist eine plausible Erklärung für den inflammatorischen Effekt von CCL17.

Heiseke et al. postulieren darüber hinaus einen autokrinen Effekt von CCL17 auf DC, welcher bei gleichzeitiger TLR-Aktivierung Zytokin-vermittelt ein Überwiegen von Th17-Zellen gegenüber regulatorischen Foxp3⁺ T-Zellen bewirkt (Heiseke, Faul et al. 2012).

Um den Effekt von CCL17 auf DC im menschlichen System zu erforschen, wurden Mono-DC mit rekombinantem CCL17 jeweils in An- oder Abwesenheit eines TLR-Liganden stimuliert und anschließend mittels ELISA auf ihre Zytokinsekretion hin untersucht. Den Zytokinen TNF- α , IL-6 und IL-12 wird eine wichtige Rolle in der Pathogenese von CED zugeschrieben (Atreya, Mudter et al. 2000, Podolsky 2002, Mannon, Fuss et al. 2004, Liu, Xia et al. 2013). Daher wurden die Konzentrationen von TNF- α , IL-6 und der p40-Untereinheit von IL-12 im Überstand der Mono-DC-Kultur als Endpunkt des Experiments bestimmt.

Mono-DC wurden jeweils 24 und 48 Stunden lang mit CCL17 in verschiedenen Konzentrationen, je 0, 1, 10 oder 100 ng/ml, versetzt. Zusätzlich wurde in allen Ansätzen mit je 0, 1, 10 oder 100 ng/ml LPS als TLR-4-Ligand stimuliert. Anschließend wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie der Phänotyp und der Aktivierungsgrad der Zellen unter den verschiedenen Bedingungen bestimmt.

Die Stimulation mit LPS zeigte dabei eine konzentrationsabhängige verstärkte Expression der DC-Marker CD11c und HLA-DR sowie der Reife-Parameter CD83 und CD86. Die Anwesenheit von CCL17 beeinflusste die Differenzierung der Zellen nicht maßgeblich, weder nach 24 h noch nach 48 h.

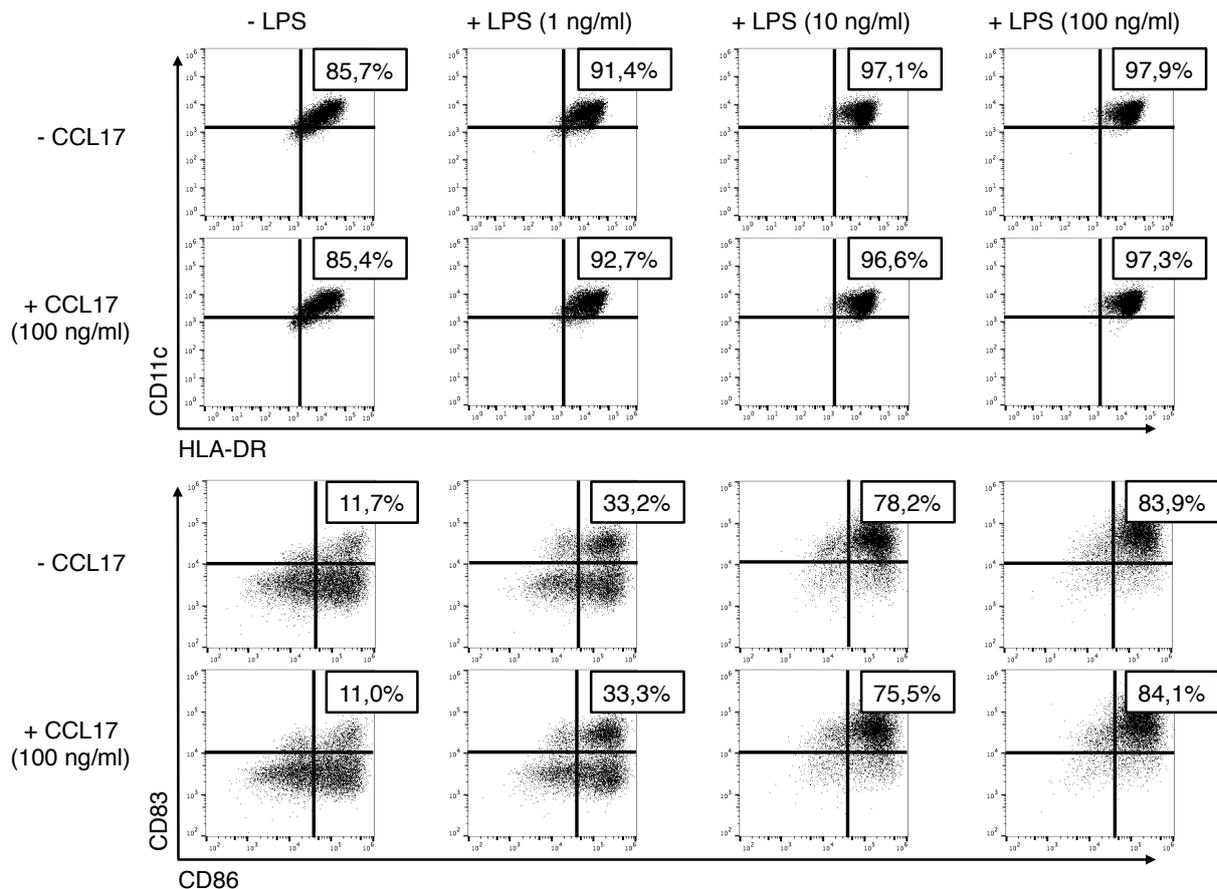


Abb. 18. Reifung und Differenzierung von Mono-DC nach Stimulation mit CCL17 und LPS in unterschiedlichen Konzentrationen.

Mono-DC wurden aus Buffy-Coat generiert (s. Methoden 2.3.3) und 24 h bzw. 48 h mit CCL17 und/oder LPS in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Exemplarische Darstellung der mittels Durchflusszytometrie nach 24 h gemessenen Expression von CD11c, HLA-DR, CD83 und CD86.

Die Überstände der Mono-DC-Kulturen wurden abgenommen und mittels ELISA auf ihre Zytokinkonzentrationen untersucht. Zwar konnte eine deutliche Induktion der Sekretion von TNF- α , IL-6 und IL-12p40 durch LPS in konzentrationsabhängigem Ausmaß beobachtet werden, doch bei den Zellen, die mit der jeweils gleichen LPS-Menge behandelt wurden, ließ sich kein wesentlicher Einfluss einer zusätzlichen Stimulation mit CCL17 auf die Zytokinantwort erkennen.

Die Hypothese eines proinflammatorischen Effektes von CCL17 auf DC durch Freisetzung von Zytokinen kann somit in diesem Modell nicht weiter untermauert werden, wobei die konstitutive Sekretion von CCL17 durch Mono-DC zu berücksichtigen ist.

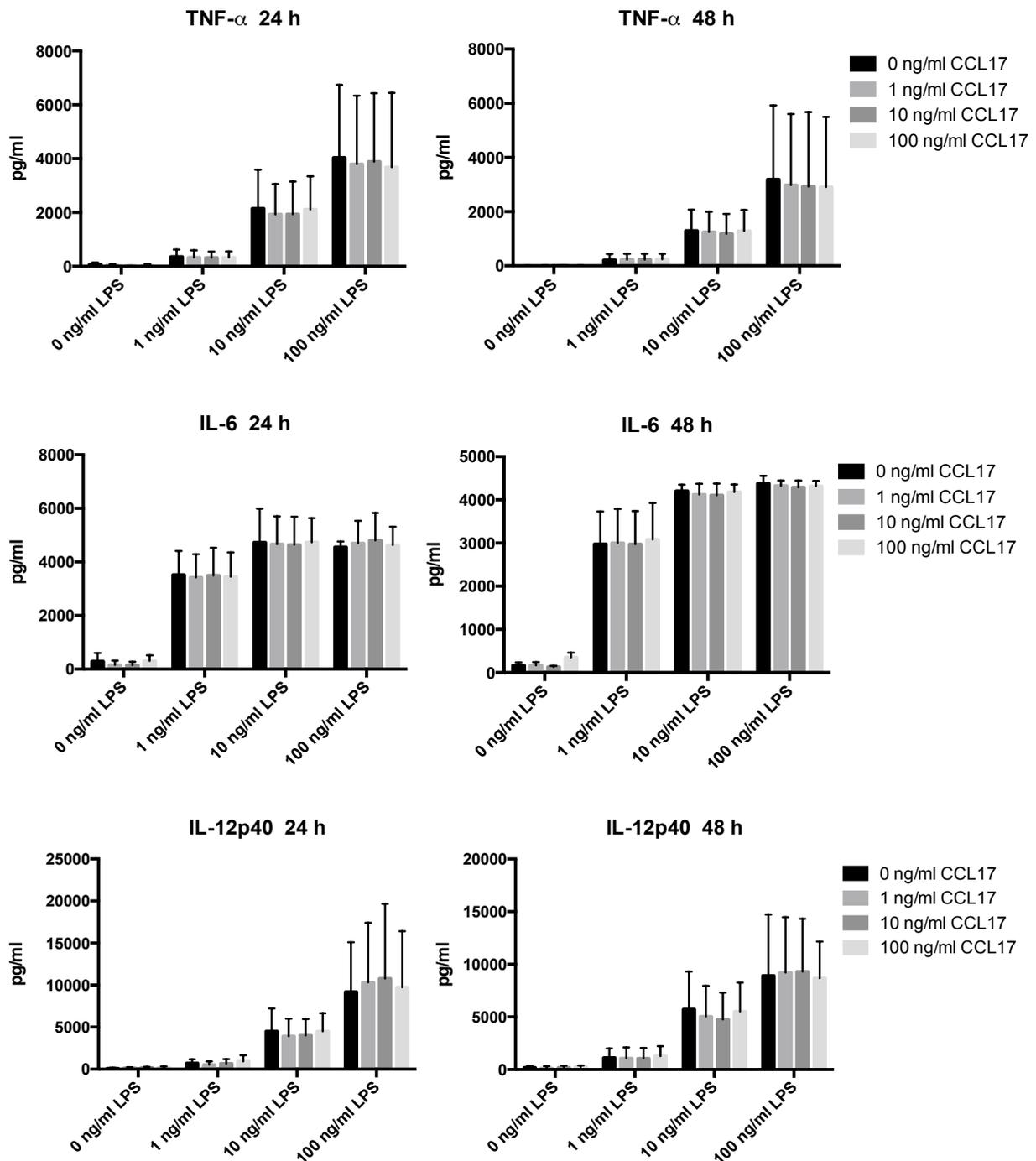


Abb. 19. Zytokinsekretion von Mono-DC nach Stimulation mit CCL17 und LPS in unterschiedlichen Konzentrationen.

Mono-DC wurden aus Buffy-Coat generiert (s. Methoden 2.3.3) und mit CCL17 und/oder LPS in unterschiedlicher Konzentration stimuliert. Nach 24 h und 48 h wurden die ZytokinKonzentrationen der Überstände mittels ELISA bestimmt. Die Graphen zeigen Mittelwert und SD. Alle Ansätze wurden in Duplikaten ausgeführt. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten sind abgebildet.

4 Diskussion

4.1 Übersicht über die experimentellen Befunde

Gewebeproben der intestinalen Mukosa von Patienten mit MC oder CU sowie gesunden Kontrollprobanden wurden auf die mRNA-Expression von CCL17 untersucht. Es zeigte sich eine stärkere Expression im entzündeten Ileum und Kolon von MC Patienten und entzündeten Kolon von Patienten mit CU gegenüber nicht entzündetem und gesundem Gewebe.

Die Expression von CCL22, Foxp3 und IL-17A war ebenfalls im entzündeten Gewebe der CED Patienten stärker ausgeprägt als in nicht entzündeter bzw. gesunder Mukosa.

Weiterhin ergab sich eine deutliche lineare Korrelation der Expression von CCL17 mit der Expression von CCL22 und Foxp3 in allen untersuchten Gewebeproben. Die Expression von IL-17A korrelierte nur im Kolon von MC und CU Patienten mit der CCL17-Expression, während im Ileum von MC Patienten eine Korrelation unwahrscheinlich erschien.

Patienten mit aktiver CED wiesen im Durchschnitt einen erhöhten CCL17-Serumspiegel auf. Es zeigte sich dabei aber eine breite Streuung der Werte der einzelnen Patienten und ein Zusammenhang zur Schwere der Erkrankung ließ sich nicht feststellen.

Mit dem Ziel, die zelluläre Quelle für CCL17 im menschlichen Darm zu identifizieren, wurden verschiedene Zellpopulationen der Darmschleimhaut auf Protein- und mRNA-Ebene auf ihren CCL17-Gehalt untersucht. Dabei zeigte sich, dass vor allem DC und Monozyten/Makrophagen CCL17 exprimieren. Die stärkste Expression wurde in DC gemessen.

Ein direkter Effekt von CCL17 auf die Ausreifung und Zytokinproduktion von DC *in vitro* konnte in einem einfachen Versuchsansatz durch die Stimulation von Mono-DC mit LPS und CCL17 jeweils in verschiedenen Konzentrationen nicht beobachtet werden.

4.2 Methodendiskussion

4.2.1 Auswahl von Patienten und Gewebe

Die korrekte Auswahl und Kategorisierung des Patientenmaterials ist entscheidend, um den Einfluss von Störfaktoren auf die untersuchten Hypothesen gering zu halten.

CED Patienten und Kontrollgruppe

Die Diagnose MC oder CU wurde nach klinischen, endoskopischen, laborchemischen und pathologischen Standardkriterien gestellt. Der Großteil der Patienten befand sich in langfristiger Behandlung in der Spezialambulanz für CED des Universitätsklinikums München Rechts der Isar. Jedweder Zweifel an der korrekten Diagnose, sei es durch den klinischen, pathologischen oder endoskopischen Befund, führte zum Ausschluss des Patienten. Von der Richtigkeit der Diagnosestellung kann also mit großer Sicherheit ausgegangen werden.

Die Vorsorge-Koloskopie bietet eine ideale Möglichkeit, Darmgewebe von gesunden Kontrollprobanden ohne intestinale Komorbiditäten zu gewinnen. Bei Patienten mit maligner Grunderkrankung wurde das Gewebe nie aus unmittelbarer Nähe des Tumors entnommen, sodass ein Einfluss auf das mukosale Immunsystem unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen, ist. Bei Gewebeproben, die bei der Rückverlagerung eines transienten Ileostomas gewonnen wurden, waren hingegen geringgradige entzündliche und regenerative Veränderungen zu erwarten und auch histologisch erkennbar. Generell wurden Patienten mit Erkrankungen, die sich bekanntermaßen auf die Expression von CCL17 auswirken, wie Asthma oder atopische Dermatitis, ausgeschlossen. Das Geschlechterverhältnis der Kontrollgruppe war ausgewogen, lediglich der Altersdurchschnitt war deutlich höher als der der CED Patienten. Zwar wirkt sich das Alter in vielerlei Hinsicht auf die Immunantwort aus (Wu and Meydani 2008), in dieser Studie war jedoch kein Einfluss des Alters auf die CCL17-Expression in den einzelnen Subgruppen und in der Gesamtheit der Probanden erkennbar.

Methoden der Gewebegewinnung

Dass die Art und Weise der Probengewinnung Einfluss auf die mRNA-Expressionsmuster mukosaler Zellen hat, ist prinzipiell möglich. Während bei der endoskopischen Probenentnahme der Darm kaum beeinträchtigt wird, könnten eine

Ischämie oder traumatische Gewebsverletzung, die einer chirurgischen Resektion vorausgehen können, eine Veränderung von Immunzellen des Darms verursachen. Ein Einfluss der Methode der Gewebeentnahme auf die CCL17-Expression konnte in dieser Arbeit jedoch nicht identifiziert werden. Ein Vergleich ist aber generell schwierig, da zwischen Patienten, die operiert werden müssen, und Patienten, die sich einer Endoskopie unterziehen, auch Unterschiede im Krankheitsprofil zu erwarten sind.

Einfluss der Therapie der CED Patienten

Die Untersuchung von CED Patienten im natürlichen Krankheitsverlauf ist in der Praxis kaum möglich, da die meisten Patienten unter CED-spezifischer Therapie stehen. Glukokortikoide, Immunsuppressiva und antiphlogistische Substanzen, sind die gebräuchlichsten Medikamente. Auch TNF- α -Antagonisten sind mittlerweile vor allem in der Therapie des MC weit verbreitet. Während die Effekte von Steroiden und älteren Immunsuppressiva, wie Azathioprin, vergleichsweise gut untersucht sind (Brattsand and Linden 1996, Thomas, Myhre et al. 2005), ist über die genauen Auswirkungen der TNF- α -Blockade auf andere Mediatoren und Signalwege noch wenig bekannt. Von einer Beeinflussung der Zytokin- und Chemokinexpressionsmuster durch die CED-Medikation muss aber ausgegangen werden (Moriconi, Raddatz et al. 2007, Velikova, Kyurkchiev et al. 2017).

Zwar wurden in dieser Arbeit keine auffälligen Einflüsse der Therapie auf die CCL17-Expression in den verschiedenen Therapie-spezifischen Subgruppen festgestellt, doch besitzt diese Analyse aufgrund der geringen Stichprobenanzahl in den einzelnen Subgruppen und des vermutlich vorliegenden Bias, das aus der Abhängigkeit der Therapieform von der Schwere der Erkrankung resultiert, begrenzte Aussagekraft.

Kategorisierung des Gewebes der CED Patienten

Die Entscheidung, ob Gewebe von CED Patienten als entzündet oder nicht entzündet eingestuft wurde, wurde anhand von makroskopischen Aspekten (bei der Endoskopie oder der makroskopischen Untersuchung des OP-Präparates) getroffen. Makroskopisch sichtbare Effekte einer Entzündungsreaktion sind beispielsweise Rötung durch Hyperämie, Verschwinden der mukosalen Gefäßzeichnung durch

ödematöse Schwellung, Ulzerationen und Kontaktblutungen oder Fibrinbeläge (Christensen and Rubin 2016). Doch welche entzündlichen Prozesse sich mikroskopisch abspielen, kann dadurch nicht exakt bestimmt werden. So können in der frühen Phase bereits Aktivierung, Infiltration und Mediatorausschüttung verschiedener Immunzellen stattgefunden haben, noch bevor mit bloßem Auge sichtbare Effekte eintreten. Ebenso kann sich makroskopisch stark alteriert erscheinendes Gewebe bereits in der Regenerationsphase befinden oder Narbengewebe darstellen.

In der vorliegenden Arbeit bestätigte der histopathologische Befund in der Regel die makroskopische Einschätzung. Insbesondere als entzündet eingestuftes Gewebe zeigte typische mikroskopische Entzündungszeichen. In einigen Fällen ergaben sich jedoch Hinweise, dass makroskopisch unauffällig erscheinendes Gewebe mikroskopisch doch eine gewisse Entzündungsaktivität aufweisen könnte. Allerdings war eine eindeutige Zuordnung der Lokalisation der Probe für Forschungszwecke zur Probe für die histologische Untersuchung nicht immer möglich, sodass auf eine nachträgliche Änderung der Einstufung verzichtet wurde. Somit ist in Betracht zu ziehen, dass die geringfügig stärkere Expression von CCL17 im nicht entzündeten Gewebe von CED Patienten auf die teilweise doch vorhandene mikroskopische Entzündung zurückzuführen ist.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass in der Kategorie des nicht entzündeten CED-Gewebes nicht unterschieden wurde, ob eine Probe von einem Patienten in Remission oder einem Patienten mit aktiver Erkrankung aus einem nicht betroffenen Areal stammte. Auch wurde bei MC Patienten nicht beachtet, ob das nicht entzündete Gewebe jemals von der Krankheit betroffen war oder nicht (etwa bei Patienten mit reinem Ileum- bzw. Kolon-Befall). All diese Fälle sind sicherlich nicht als gleichwertig zu betrachten. Doch da in der Gruppe des nicht entzündeten CED-Gewebes keine wesentliche Steigerung der CCL17-Expression zu beobachten war und auch in der Literatur nicht beschrieben ist – sowohl bei nicht entzündetem Gewebe von Patienten mit aktiver Erkrankung (Jugde, Alizadeh et al. 2001, Autschbach, Giese et al. 2002) als auch bei Patienten ohne Krankheitsaktivität (Christophi, Rong et al. 2012) –, erscheint eine weitere Differenzierung dieser Gruppe nicht notwendig.

4.2.2 Nachweismethoden von CCL17

Die qRT-PCR ist eine hochsensitive Methode zum Nachweis von DNA, die auch mit sehr geringen Gewebemengen durchführbar ist. In Kombination mit der reversen Transkription ist sie die gängigste Methode zur Bestimmung des mRNA-Gehaltes einer Probe. Doch inwiefern die mRNA-Expression eines Genes tatsächlich mit dem Level des fertigen Proteins korreliert und damit auch dessen Funktion widerspiegelt, ist noch immer Gegenstand reger Diskussion. Auf dem Weg von der mRNA zum Protein spielen posttranskriptionelle sowie posttranslationale Mechanismen eine regulierende Rolle (de Sousa Abreu, Penalva et al. 2009). Diese scheinen sich je nach Gen unterschiedlich stark auszuwirken, denn die Korrelation der mRNA-Expression mit der Proteinkonzentration ist für unterschiedliche Gene verschieden stark ausgeprägt (Koussounadis, Langdon et al. 2015). Koussounadis et al. demonstrierten, dass diese Korrelation für unter verschiedenen experimentellen Konditionen unterschiedlich exprimierte mRNA besonders stark ist, und stützen damit die These, dass Änderungen der mRNA-Expression repräsentativ auch für Änderungen auf Proteinebene sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine gesteigerte CCL17-mRNA-Expression im entzündeten Darm von CED Patienten in Proben der gesamten Mukosa nachgewiesen. Diese Ergebnisse beziehen sich also auf den gesamten mRNA-Gehalt aller mukosalen Zellpopulationen im Durchschnitt. Ob dies durch eine gesteigerte Transkription der CCL17-produzierenden Zellen oder durch vermehrte Infiltration dieser Zellen und damit höheren Anteil an der Gesamtheit der mukosalen Zellen zustande kommt, lässt sich aus diesem Ergebnis nicht ableiten. Doch die hier demonstrierte starke CCL17-Expression durch DC aus der entzündeten Mukosa gegenüber DC aus gesundem Gewebe, lässt auf eine Hochregulierung der Transkription auf zellulärer Ebene schließen.

Der ELISA weist CCL17 auf Proteinniveau nach und liefert darüber hinaus eine absolute Quantifizierung. So stellt er eine wertvolle Ergänzung zur Bestimmung der mRNA-Expression mittels pRT-PCR dar. Der CCL17 ELISA wurde zur Bestimmung der Konzentration von CCL17 im Serum eingesetzt. Die zusätzliche Messung von CCL17 im Überstand von Darmgewebe-Kulturen oder die Kultur isolierter Zellpopulationen aus Darmgewebe wäre zusätzlich aufschlussreich gewesen, konnte

aber aufgrund des begrenzt verfügbaren Patientenmaterials nicht durchgeführt werden.

Die Durchflusszytometrie ist eine geeignete Methode, um ein anfärbbares Protein einem bestimmten Zelltyp zuzuordnen zu können, der durch seine Oberflächenantigene charakterisiert wird, und ist auch bei geringen Zellzahlen anwendbar. Daher wurde in dieser Arbeit ein Protokoll zur intrazellulären Färbung von CCL17 in humanen Darmzellen erarbeitet. Diese Methode war in erster Linie durch das schwache Signal der intrazellulären CCL17-Färbung und die oft sehr geringe Anzahl der DC und Makrophagen in den untersuchten mukosalen Zellen limitiert.

Dazu ist noch zu erwähnen, dass sich ein positives Signal in der Fraktion der APC simultan zur Positivkontrolle in einer Verschiebung der Fluoreszenzintensität der gesamten CCL17-gefärbten Zellen gegenüber der Isotypkontrolle präsentierte, während unter den CD45-negativen Zellen oftmals einige wenige sehr stark fluoreszierende Zellen auffielen, was möglicherweise eher als Artefakt zu werten ist. Vor diesem Hintergrund müssen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit intrazellulärer Färbung von CCL17 mit Vorsicht betrachtet werden. Eine Expression von CCL17 in Nicht-Immunzellen des Darms (vor allem Epithelzellen) wurde auf mRNA-Ebene nicht bestätigt und ist daher unwahrscheinlich.

4.2.3 Wirkung von CCL17 *in vitro*

Eine Induktion von IL-12 in DC durch Stimulation mit CCL17 und LPS, wie sie Heiseke et al. (Heiseke, Faul et al. 2012) bei Mäusen beobachteten, konnte anhand humaner Mono-DC nicht nachvollzogen werden. Ein Effekt von CCL17 auf DC *in vivo* ist damit aber keinesfalls ausgeschlossen. Erstens sind Mono-DC experimentell generierte Zellen und damit nicht zwangsläufig repräsentativ für alle Gruppen von DC im menschlichen Darm. Zweitens fehlten *in vitro* möglicherweise weitere kostimulatorische Faktoren, die unter natürlichen Bedingungen vorhanden sind. Drittens ist davon auszugehen, dass Mono-DC bereits relevante Spiegel von CCL17 produzieren (s. Ergebnisse 3.3.1). Mittels ELISA wurde im Überstand von nicht weiter stimulierten Mono-DC Kulturen eine CCL17-Konzentration von ca. 10 ng/ml gemessen. Möglicherweise entfaltet CCL17 bei dieser Konzentration bereits seine volle Wirkung und daher wird durch eine Erhöhung der Konzentration kein weiterer Effekt hervorgerufen. Viertens wurde nur der Effekt im Zusammenspiel mit einem

TLR-4-Ligand auf drei verschiedene Zytokine untersucht. In den erwähnten Untersuchungen an murinen DC wurden CCL17-knockout Zellen verwendet, die mit ansteigenden Konzentrationen von CCL17 rekonstituiert wurden und dann eine höhere IL-12 Produktion nach niedrig dosierter LPS Stimulation zeigten (Heiseke, Faul et al. 2012).

Um die Wirkung von CCL17 auf DC beim Menschen weiter eingrenzen zu können, sind weitere Experimente nötig. Mögliche Ansätze sind die Untersuchung von DC-Zytokinprofilen unter CCL17- und/oder CCR4-Blockade mit neutralisierenden Antikörpern oder Inhibitoren, die Erweiterung der verwendeten TLR-Liganden und gemessenen Mediatoren oder die Untersuchung von DC *ex vivo*. Eine weitere interessante Möglichkeit, die Funktion von CCL17 im menschlichen Immunsystem genauer zu untersuchen, wäre die Herstellung und Verwendung von CCL17-knockout Zelllinien.

4.3 Eigene Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur

4.3.1 Expression von CCL17 bei Patienten mit CED

CCL17-Expression in der intestinalen Mukosa

Die mRNA-Expression von CCL17 im Darm von Patienten mit CED wurde bereits in drei wissenschaftlichen Originalarbeiten untersucht (Jugde, Alizadeh et al. 2001, Autschbach, Giese et al. 2002, Christophi, Rong et al. 2012). Tab. 2 gibt einen Überblick über die Ergebnisse und Herangehensweisen dieser Studien im Vergleich zur vorliegenden Arbeit.

	Jugde et al.	Autschbach et al.	Christophi et al.	Eigene Ergebnisse
CCL17-Expression				
MC, Kolon entzündet	↑↑* (n=22)	↑↑ (n=40)	– (n=20)	↑ (n=16)
MC, Ileum entzündet	– (n=8)			↑* (n=30)
MC, Kolon nicht entzündet	– (n=18)	– (n=27)	– (n=15)	– (n=28)
MC, Ileum nicht entzündet				– (n=25)
CU, Kolon entzündet	↑ (n=9)	↑↑ (n=25)	↑↑* (n=21)	↑↑* (n=17)
CU, Kolon nicht entzündet	– (n=5)	– (n=15)	– (n=17)	– (n=19)
Entzündliche Kontrolle	↑* (n=4)	↑ (n=10)		
Art der Proben				
Gewinnung	Endoskopie und OP	OP	Endoskopie	Endoskopie und OP
Gewebeart	Mukosa	Transmurale Gewebeproben	Mukosa	Mukosa
Ausgangsmaterial	Frischgewebe	Frischgewebe	FFPE-Gewebe	Frischgewebe
Histologischer Abgleich	nein	ja	ja	nein

Tab. 2. Vergleich der mRNA-Expression von CCL17 aus der Literatur mit den eigenen Ergebnissen.

„↑“ steht für mindestens 2-fache Expression gegenüber der gesunden Kontrolle, „↑↑“ zeigt mehr als 5-fache Expression an und „–“ bedeutet, dass kein wesentlicher Unterschied erkennbar war. * kennzeichnet statistische Signifikanz ($P < 0,05$), wobei Autschbach keine Angaben zur Signifikanz seiner Werte macht. FFPE bedeutet „Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet“. Mit „histologischem Abgleich“ ist die Bestätigung der makroskopischen Einschätzung des Gewebes als entzündet oder nicht entzündet durch histopathologische Begutachtung durch zwei unabhängige Gutachter gemeint.

Zusammengefasst fanden Jugde et al. eine gesteigerte CCL17-Expression im entzündeten Kolon von MC und CU Patienten, doch keine wesentliche Steigerung im Ileum von MC Patienten. Autschbach et al. zeigten ebenfalls eine Induktion der CCL17-Expression im entzündeten Gewebe von MC und CU Patienten, wobei sie bei MC Kolon und Ileum zusammengefasst betrachteten. Christophi et al. hingegen

beobachteten eine Induktion nur im entzündeten Darm von Patienten mit CU (ca. 20-fach gesteigerte Expression verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe). Bei MC (es wurde nur das Kolon untersucht) fand sich keine wesentliche Steigerung der CCL17-Expression. Eine verstärkte Expression im nicht entzündeten Gewebe von CED Patienten konnte in keiner der Arbeiten nachgewiesen werden. Jugde und Autschbach untersuchten auch aus anderen Ursachen entzündetes Darmgewebe, etwa von Patienten mit Divertikulitis, infektiöser oder ischämischer Kolitis, und fanden CCL17 ebenfalls verstärkt exprimiert vor. Methodisch überzeugt besonders Christophi, da hier die mRNA und die Histologie zur Beurteilung der Entzündungsreaktion aus dem genau gleichen Gewebefragment gewonnen wurden. Auch wurden die Patienten der einzelnen Kategorien nach Alter und Geschlecht passend ausgewählt und Patienten, die eine Anti-TNF- α -Therapie erhalten hatten, wurden ausgeschlossen. Warum gerade in dieser Arbeit keine gesteigerte CCL17-Expression bei Patienten mit MC gefunden werden konnte, ist fraglich. Dennoch deutet die Zusammenschau der Literatur auf eine Erhöhung der Expression von CCL17 in der entzündeten intestinalen Mukosa von Patienten mit MC und CU hin. Die vorliegende Arbeit demonstriert dabei erstmalig einen signifikanten Unterschied auch im Ileum von MC Patienten.

CCL17-Expression im Serum

Wie bereits erwähnt, konnten erhöhte Serumspiegel von CCL17 bei einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen gefunden werden. Bei einigen davon hat die Höhe des CCL17-Wertes im Blut sogar einen prädiktiven Wert bezüglich der Schwere der Erkrankung (Ogawa, Morito et al. 2013, Kataoka 2014, Komatsu-Fujii, Chinuki et al. 2018). Bei Patienten mit CED war bislang wenig über die Expression von CCL17 im Blut und deren Bedeutung bekannt. In dieser Arbeit wurde zwar ein höherer durchschnittlicher CCL17-Serumspiegel bei Patienten mit MC und CU verglichen mit gesunden Personen gefunden, doch nicht alle Patienten mit aktiver CED zeigten erhöhte Werte, sodass die CCL17-Bestimmung im Blut sich nicht als Aktivitätsparameter bei CED eignet. Diese Tatsache ist insofern nicht weiter verwunderlich, da aufgrund der lokalen Entzündungsreaktion bei CED auch andere systemische Entzündungszeichen, wie eine CRP (C-reaktives Protein)- oder IL-6-Erhöhung, fehlen können (Funderburg, Stubblefield Park et al. 2013). Ob eine

Erhöhung des Serumspiegels von CCL17 bei CED Patienten eine bestimmte Subgruppe von Patienten charakterisiert, beispielsweise Patienten mit extraintestinaler Manifestation, bleibt noch zu klären.

4.3.2 CCL17-produzierende Zellpopulationen

Eine Expression von CCL17 konnte in verschiedenen Zelltypen unter bestimmten Voraussetzungen nachgewiesen werden. Tab. 3 fasst einige relevante Publikationen zusammen.

Der Großteil der Daten aus dem humanen System wurde dabei unter *in vitro* Bedingungen und Verwendung bestimmter Stimulanzen gewonnen. Doch die Tatsache, dass bestimmte Zelltypen separat betrachtet unter experimentellen Bedingungen zur CCL17-Produktion angeregt werden können, begründet nicht zwangsläufig eine Bedeutung dieser Funktion der jeweiligen Zellen *in vivo*. Daten darüber, welche Zellen tatsächlich beim Menschen physiologisch und bei verschiedenen Krankheitsgeschehen in relevantem Ausmaß CCL17 produzieren, sind rar. Patienten mit atopischer Dermatitis zeigten eine starke Expression von CCL17 in Keratinozyten, die mittels Immunhistochemie nachgewiesen wurde (Vestergaard, Bang et al. 2000). Perros et al. konnten in einem humanisierten Asthma-Modell DC als hauptsächliche Quelle für CCL17 identifizieren, indem sie Ko-Immunfluoreszenz-Färbungen von CCL17 und CD11c anfertigten (Perros, Hoogsteden et al. 2009). Welche Zellen im menschlichen Darm vorwiegend CCL17 bilden, wurde bislang noch nicht untersucht. Alferink et al. liefern jedoch wertvolle Informationen zur Situation im Mausmodell. Mit Hilfe einer Reporter-Maus, die unter dem Einfluss des CCL17-Promotors ein fluoreszierendes Protein exprimiert, konnten sie zeigen, dass CCL17 hauptsächlich von CD11b⁺ DC in den Grenzflächen-Geweben Lunge, Haut und Darm sowie den jeweiligen drainierenden Lymphknoten gebildet wird (Alferink, Lieberam et al. 2003).

Zellpopulation	System	Klinischer Kontext	Stimulus	Quelle
Thymozyten	Mensch	allgemein	konstitutiv	(Imai, Yoshida et al. 1996)
PBMC			Phytohäm-agglutinin	
Monozyten		Arthritis	GM-CSF	(Achuthan, Cook et al. 2016)
Mono-DC		allgemein	TNF- α / Prosta-glandin E2	(Rubio, Means et al. 2005)
Makrophagen		Asthma	Asthma in vivo	(Staples, Hinks et al. 2012)
Keratinozyten		AD	TNF- α / IFN- γ ; AD in vivo	(Vestergaard, Bang et al. 2000, Komine, Kakinuma et al. 2005)
B-Zellen		AD	Anti-CD40 / IL-4	(Lin, Nonoyama et al. 2003)
DC		Arthritis	LPS	(Radstake, van der Voort et al. 2005)
		AD	TSLP	(Soumelis, Reche et al. 2002)
		Asthma	Hausstaub-milbe*	(Perros, Hoogsteden et al. 2009)
	NOD1-Liganden		(Ait Yahia, Azzaoui et al. 2014)	
Langerhans-Zellen	Maus	allgemein	TLR-Liganden	(Alferink, Lieberam et al. 2003)
		Allergie	Papain / IL-13	(Halim, Hwang et al. 2016)
		allgemein	TLR-Liganden	(Alferink, Lieberam et al. 2003)
		AD	TNF- α / IL-4	(Xiao, Fujita et al. 2003)
		Makrophagen	Arthritis	GM-CSF

Tab. 3. Übersicht über bislang identifizierte CCL17-produzierende Zellen.

Auswahl einiger Publikationen, die eine Expression von CCL17 in bestimmten Zelltypen zeigen. AD: Atopische Dermatitis; *hier wurden humane PBMC von auf Hausstaubmilben sensibilisierten Asthmatikern in Mäuse transferiert und diese mit Hausstaubmilben konfrontiert.

Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise darauf, dass in der menschlichen Darmschleimhaut analog zur Situation in der Maus CCL17 vorwiegend von DC produziert wird. Im Gegensatz zum akuten Kolitis-Modell der Maus, in dem die Expression von CCL17 exklusiv in DC zu beobachten war (Heiseke, Faul et al. 2012), exprimieren aber auch Monozyten/Makrophagen in der Darmschleimhaut von CED Patienten CCL17 und sind aufgrund ihrer höheren Frequenz ebenfalls als eine wichtige Quelle für dieses Chemokin anzusehen.

4.3.3 Wirkungsweisen von CCL17

Als Effekt von CCL17 wird in der Regel die CCR4-vermittelte Rekrutierung von T-Zellen angenommen (Imai, Nagira et al. 1999, Solari and Pease 2015). Eine Wirkung von CCL17 über andere Chemokinrezeptoren, wie CCR8 (Bernardini, Hedrick et al. 1998), CCR7 oder CXCR4 (Stutte, Quast et al. 2010) wurde nur vereinzelt beschrieben.

Heiseke et al. postulierten erstmals eine direkte Wirkung von CCL17 auf DC. Die Untersuchung dieser Fragestellung ging aus der Beobachtung hervor, dass ein Fehlen des CCR4-Rezeptors auf T-Zellen nicht den gleichen protektiven Effekt bezüglich der Entwicklung einer Kolitis hervorbringen konnte, der durch die Abwesenheit von CCL17 erreicht wurde (Heiseke, Faul et al. 2012). Somit konnte eine fehlende CCR4-vermittelte Rekrutierung von T-Lymphozyten nicht die alleinige Ursache des in diesem Modell entzündlich wirkenden CCL17 sein.

In einem ersten Versuch konnte zwar in dieser Arbeit kein direkter Effekt von rekombinantem CCL17 auf DC nachgewiesen werden, eine weitere Untersuchung der Wirkungsweisen von CCL17 beim Menschen ist jedoch notwendig.

4.4 Beurteilung der Ergebnisse

4.4.1 Rolle von CCL17 bei der CED Entstehung

Die verstärkte Expression von CCL17 in der entzündeten Mukosa von Patienten mit CED liefert einen ersten Hinweis darauf, dass diesem Chemokin eine Rolle in der Krankheitsentstehung zukommt. Das vermehrte Vorkommen eines Mediators alleine lässt jedoch noch nicht auf dessen Funktion schließen. So zeigte sich beispielsweise auch die Expression von Foxp3 erhöht, was auf das Vorhandensein regulierender Mechanismen im Entzündungsgeschehen hindeutet.

Heiseke et al. lieferten mit der Demonstration des protektiven Effekts der Abwesenheit von CCL17 auf die Kolitis-Entwicklung bei Mäusen die Grundlage für die nähere Betrachtung von CCL17 als potentielle therapeutische Zielstruktur bei Patienten mit CED. Da bislang noch wenig über die Verbreitung und Funktion von CCL17 im gastrointestinalen System bekannt war, wurden in dieser Arbeit auch grundlegende Fragen, wie die nach der CCL17-produzierenden Zellpopulation im menschlichen Darm, bearbeitet. Dass dabei analog zum Mausmodell DC als vorwiegende Quelle für CCL17 identifiziert werden konnten, demonstriert die Parallelen zwischen Mensch und Maus in diesem Zusammenhang und gibt Anlass zur weiteren Erforschung von CCL17 bei der Entstehung von MC und CU.

Wie eingangs bereits erläutert, ist theoretisch ein proinflammatorischer Effekt von CCL17 über die Rekrutierung CCR4-tragender Effektor-T-Zellen ebenso wie eine entzündungshemmende Wirkung durch das Anlocken regulatorischer T-Zellen denkbar.

Neben Th1- und Th2-Zellen sind sowohl Th17-Zellen als auch Foxp3⁺ Treg in der entzündeten Mukosa von CED Patienten vermehrt. Die massive Infiltration von Th17-Zellen in die intestinale Mukosa bei MC und CU (Zenewicz, Antov et al. 2009) wird als zentraler Krankheitsmechanismus angenommen (Weaver, Elson et al. 2013). Zudem konnten Ban et al. Foxp3 immunhistochemisch in der Mukosa von Patienten mit aktivem MC oder CU, nicht jedoch in gesunder Darmschleimhaut nachweisen (Ban, Andoh et al. 2008). Wang et al. beobachteten im Einklang mit der vorliegenden Arbeit eine gesteigerte Expression von Foxp3 auf mRNA- und Protein-Ebene in der entzündeten Mukosa von CED Patienten, einhergehend mit der Abnahme des Anteils von Treg im peripheren Blut (Wang, Liu et al. 2011). TGF- β ist der wesentliche gemeinsame Faktor in der Entstehung von Foxp3⁺ Treg und Th17-Zellen. Es induziert sowohl Foxp3 (Zhu and Paul 2010) als auch ROR γ t (engl. retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gamma t), einen zentralen Transkriptionsfaktor in der Entstehung von Th17-Zellen (Ivanov, Frutos Rde et al. 2008). Zusammen mit IL-10 und Retinolsäure fördert TGF- β die Treg-Entstehung aus naiven CD4⁺ Vorläufer-T-Zellen, was gleichzeitig die Th17-Zell-Entwicklung inhibiert (Zhou, Lopes et al. 2008), während die Anwesenheit von inflammatorischen Zytokinen, wie IL-6/23, die Differenzierung zu Th17-Zellen induziert und im Gegenzug die Treg-Entstehung unterdrückt (Bettelli, Carrier et al. 2006). Somit wird

ein reziprokes Gleichgewicht zwischen Th17-Zellen und Treg angenommen. Eastaff-Leung et al. zeigten eine Verminderung der Treg bei gleichzeitiger Vermehrung der Th17-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit CED und schlussfolgerten, dass das inflammatorische Zytokin-Milieu der Mukosa bei CED die Generierung von Th17-Zellen und Inhibierung von Treg fördert (Eastaff-Leung, Mabarrack et al. 2010).

Im Zusammenhang mit CCL17 beobachtete Heiseke bei CCL17-defizienten Mäusen, die im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen vor der Induktion einer schweren experimentellen Kolitis geschützt waren, eine verringerte Expression von IL-17 in der Kolon-Mukosa dieser Mäuse, ein geringeres Potential CCL17-defizienter DC zur T-Zell-Aktivierung *in vitro* und eine Expansion von Foxp3⁺ Treg in intraepithelialen und mesenterialen Lymphknoten *in vivo*, welche für einen langfristigen protektiven Effekt notwendig war (Heiseke 2012). Weiterhin konnte er nachweisen, dass für den genannten Schutz vor experimenteller Kolitis bei CCL17-Knockout-Mäusen die Expression von CCR4 auf Zellen des angeborenen Immunsystems essentiell war, während eine CCR4-Expression in T-Zellen nicht erforderlich war. Aus diesen Ergebnissen wurde folgendes Modell der Wirkung von CCL17 in der Entstehung von CED postuliert: CCL17 stimuliert DC in auto- bzw. parakriner Weise und führt zur Produktion inflammatorischer Mediatoren, wie IL-6/23 und IL-12, welche das Gleichgewicht der Th-Zellen in Richtung der Th1/Th17-Zellen verschieben und die Expansion von Treg inhibieren (Heiseke 2012).

Um erste Einblicke in mögliche Parallelen im menschlichen Organismus zu gewinnen, wurde in dieser Arbeit die Expression von CCL17 mit der von Foxp3 und IL-17A korreliert. Interessanterweise war eine starke und signifikante positive Korrelation mit der Expression von CCL17 vor allem für die Expression von Foxp3 zu finden. IL-17A hingegen korrelierte im Kolon von MC und CU Patienten schwach mit CCL17, während im Ileum von MC Patienten kein linearer Zusammenhang feststellbar war. Diese Daten stützen zunächst nicht die These der CCL17-abhängigen Th17-Zell-Proliferation und Treg-Inhibition. Zu beachten ist allerdings, dass die hier generierten Daten nur die Situation in der Mukosa widerspiegeln, während Heiseke gezielt die intraepithelialen und mesenterialen Lymphknoten untersuchte, welche als entscheidender Ort für die T-Zell-Differenzierung unter dem Einfluss von aus der Mukosa migrierten DC gelten (Heiseke 2012). Dennoch deutet das Fehlen eines linearen Zusammenhanges der Expression von CCL17 und IL-17A

im Ileum von MC Patienten auf eine CCL17-unabhängige Regulation der Th17-Zell-Expansion in diesem Kontext hin.

Was die positive Korrelation von Foxp3 mit CCL17 im Kolon von CU Patienten sowie Ileum und Kolon von MC Patienten betrifft, sollte erwähnt werden, dass im Gegensatz zur Situation in der Maus Foxp3 beim Menschen laut aktuellen Erkenntnissen nicht als ausschließlich repräsentativ für immunsuppressive Treg anzunehmen ist. Bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, darunter auch CED, wurde beobachtet, dass Treg unter entzündlichen Bedingungen auch inflammatorische Zytokine sezernieren können (Jung, Kwak et al. 2017). Sogenannte Th17- und Th1-ähnliche Treg Zellen exprimieren weiterhin Foxp3, produzieren jedoch IL-17A oder IFN- γ und exprimieren den jeweils Th17- bzw. Th1-charakteristischen Transkriptionsfaktor ROR γ t bzw. T-bet (engl. T-box transcription factor) (Stock, Akbari et al. 2004, Voo, Wang et al. 2009).

Somit ist zunächst zu klären, welche Subgruppen von Foxp3⁺ Th-Zellen im Darm von Patienten mit CED vermehrt vorliegen und welche Eigenschaften diese haben. Weiterhin ist – mit Blick auf eine mögliche therapeutische Beeinflussung – von besonderem Interesse, welchen Regulationsmechanismen die Differenzierung der verschiedenen Treg-Subgruppen unterliegt und welchen Einfluss CCL17 dabei ausübt.

4.4.2 Klinische Relevanz

Letztendlich wurde diese Arbeit mit Blick auf die Entwicklung neuer Therapieansätze für Patienten mit CED angefertigt. Formen der zielgerichteten und personalisierten Therapie halten derzeit Einzug in viele Bereiche der Medizin und erzielen besonders auf dem Gebiet der Krebstherapie und der Behandlung immunologischer Erkrankungen große Erfolge. Auf dem Gebiet der immunologisch vermittelten Krankheiten nehmen die CED eine gewisse Sonderstellung ein. Hatte man sie zu Beginn ihrer Erforschung noch in die Kategorie der Autoimmunerkrankungen eingeordnet, geht man heute davon aus, dass nicht die eingeschränkte Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen sondern die gestörte Interaktion mit kommensalen Mikroorganismen des Darms den Kernpunkt der Pathogenese darstellt. Immer mehr Hinweise geben dazu Anlass, als Ursache der CED-Entstehung weniger ein hyperreaktives Immunsystem als vielmehr einen

Immundefekt anzunehmen, der dazu führt, dass angeborene Abwehrmechanismen darin versagen, eine Symbiose mit den Organismen der Darmflora aufrecht zu erhalten, und dadurch Mechanismen der adaptiven Immunantwort aktiviert werden, welche mit Kollateralschäden am körpereigenen Gewebe einhergehen.

Vor diesem Hintergrund wird verständlich, warum CED nicht analog zu anderen autoinflammatorischen Erkrankungen betrachtet werden können. Die Tatsache, dass ein bei Psoriasis und rheumatoider Arthritis erfolgreich eingesetzter neutralisierender IL-17A-Antikörper bei Patienten mit MC zu einer Verschlechterung der Symptomatik führte, verdeutlicht diesen Umstand. Man erklärt sich den unterschiedlichen Effekt unter anderem dadurch, dass in Abwesenheit von IL-17A im Darm auch die Abwehrlage gegen intestinale Mikroorganismen geschwächt und so der Krankheitsverlauf aggraviert wurde (Marwaha, Leung et al. 2012).

Ein ideales Therapeutikum zur Behandlung von CED sollte also nicht die Immunantwort generell schwächen sondern modulieren und in die richtigen Bahnen lenken. Sollte sich auch im menschlichen System bewahrheiten, dass CCL17 in Anwesenheit bakterieller Stimuli die Aktivierung von DC verstärkt, könnte dies ein sinnvoller therapeutischer Ansatzpunkt sein, da die Reaktion der DC auf bakterielle Antigene im Darm entscheidend die folgende Reaktion - Toleranz oder Auslösung einer Immunantwort - beeinflusst.

5. Zusammenfassung

Die Inzidenz chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen, mit den Hauptformen Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU), nimmt weltweit weiterhin zu. Die Standardtherapie mit antiphlogistischen Medikamenten, Glukokortikoiden, Immunsuppressiva und Tumornekrosefaktor- α -Inhibitoren erreicht nicht immer den gewünschten Behandlungserfolg. Hohe Dosen dieser Substanzen bergen zudem das Risiko gravierender Nebenwirkungen. Der Bedarf an neuen Therapiemöglichkeiten ist somit groß.

Das Chemokin (C-C motif) Ligand 17 (CCL17) wurde seit seiner Entdeckung 1996 mit vielen entzündlichen Erkrankungen, darunter atopische Dermatitis, Asthma und rheumatoide Arthritis, in Verbindung gebracht. Eine Studie demonstrierte im Tierversuch, dass Mäuse in Abwesenheit von CCL17 vor einer experimentell herbeigeführten Kolitis geschützt sind. Sie lieferte weiterhin Hinweise dafür, dass CCL17 nicht nur über die Rekrutierung von T-Zellen an den Ort der Entzündung seine Wirkung entfaltet, sondern auch in der Lage ist, dendritische Zellen – in diesem Modell die hauptsächlich CCL17-produzierende Zellart – autokrin zu stimulieren und die Ausbildung eines inflammatorischen Phänotyps dieser Zellen zu begünstigen.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Expression von CCL17 bei Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung, geht der Frage nach, welche Zellpopulation beim Menschen CCL17 bildet, und untersucht dessen Funktion bei der Entstehung intestinaler Entzündungen beim Menschen.

Die entzündete Mukosa von Patienten mit MC oder CU wies gegenüber nicht entzündeter und gesunder Schleimhaut eine verstärkte mRNA (engl. messenger ribonucleic acid)-Expression von CCL17 auf. Zusätzlich wurden im Serum von Patienten mit aktiver Erkrankung erhöhte Konzentrationen von CCL17 gefunden.

Im Darmgewebe korrelierte die Expression von CCL17 mit der des verwandten Chemokins CCL22 und des für regulatorische T-Zellen charakteristischen Transkriptionsfaktors „Foxp3“. Die Korrelation zu dem von inflammatorischen Effektor-T-Zellen gebildeten Interleukin 17A war schwächer oder nicht vorhanden.

Weiterhin wurde die Expression von CCL17 in verschiedenen Zellpopulationen der Darmschleimhaut *ex vivo* untersucht. Die Analyse auf Protein- und mRNA-Ebene deutete auf dendritische Zellen als Hauptproduzenten von CCL17 hin. Aber auch in Monozyten und Makrophagen wurde die Expression von CCL17 nachgewiesen.

Ein proinflammatorischer Effekt von CCL17 auf dendritische Zellen *in vitro*, wie er anhand von murinen Zellen gezeigt worden war, konnte in dieser Arbeit an menschlichen Zellen nicht reproduziert werden. Es bedarf jedoch weiterer Versuchsbedingungen, um die Wirkungsweisen von CCL17 im menschlichen System näher charakterisieren zu können.

Zusammengefasst ergeben sich Hinweise, dass CCL17 auch in der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen eine Rolle spielt. Um zu klären, ob dieses Chemokin einen guten Ansatzpunkt für die Entwicklung einer zielgerichteten Therapie darstellt, bedarf es weiterer funktioneller Untersuchungen beim Menschen.

6 Literaturverzeichnis

Achuthan, A., A. D. Cook, M. C. Lee, R. Saleh, H. W. Khiew, M. W. Chang, C. Louis, A. J. Fleetwood, D. C. Lacey, A. D. Christensen, A. T. Frye, P. Y. Lam, H. Kusano, K. Nomura, N. Steiner, I. Forster, S. L. Nutt, M. Olshansky, S. J. Turner and J. A. Hamilton (2016). "Granulocyte macrophage colony-stimulating factor induces CCL17 production via IRF4 to mediate inflammation." *J Clin Invest* **126**(9): 3453-3466.

Ait Yahia, S., I. Azzaoui, L. Everaere, H. Vorng, C. Chenivesse, P. Marquillies, C. Duez, M. Delacre, T. Grandjean, J. Balsamelli, M. Fanton d'Andon, Y. Fan, C. Ple, C. Werts, I. G. Boneca, B. Wallaert, M. Chamaillard and A. Tsicopoulos (2014). "CCL17 production by dendritic cells is required for NOD1-mediated exacerbation of allergic asthma." *Am J Respir Crit Care Med* **189**(8): 899-908.

Al Nabhani, Z., G. Dietrich, J. P. Hugot and F. Barreau (2017). "Nod2: The intestinal gate keeper." *PLoS Pathog* **13**(3): e1006177.

Albert, M. L., S. F. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein and N. Bhardwaj (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **188**(7): 1359-1368.

Alferink, J., I. Lieberam, W. Reindl, A. Behrens, S. Weiss, N. Huser, K. Gerauer, R. Ross, A. B. Reske-Kunz, P. Ahmad-Nejad, H. Wagner and I. Forster (2003). "Compartmentalized production of CCL17 in vivo: strong inducibility in peripheral dendritic cells contrasts selective absence from the spleen." *J Exp Med* **197**(5): 585-599.

Allchin, W. (1909). "A Discussion on Ulcerative Colitis." *Proc R Soc Med* **2**(Med Sect): 98-99.

Ananthakrishnan, A. N., H. Khalili, G. G. Konijeti, L. M. Higuchi, P. de Silva, C. S. Fuchs, W. C. Willett, J. M. Richter and A. T. Chan (2014). "Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease." *Gut* **63**(5): 776-784.

Andoh, A., H. Kuzuoka, T. Tsujikawa, S. Nakamura, F. Hirai, Y. Suzuki, T. Matsui, Y. Fujiyama and T. Matsumoto (2012). "Multicenter analysis of fecal microbiota profiles in Japanese patients with Crohn's disease." *J Gastroenterol* **47**(12): 1298-1307.

Asseman, C., S. Fowler and F. Powrie (2000). "Control of experimental inflammatory bowel disease by regulatory T cells." *Am J Respir Crit Care Med* **162**(4 Pt 2): S185-189.

Atreya, R., J. Mudter, S. Finotto, J. Mullberg, T. Jostock, S. Wirtz, M. Schutz, B. Bartsch, M. Holtmann, C. Becker, D. Strand, J. Czaja, J. F. Schlaak, H. A. Lehr, F. Autschbach, G. Schurmann, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, H. Ito, T. Kishimoto, P. R. Galle, S. Rose-John and M. F. Neurath (2000). "Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo." *Nat Med* **6**(5): 583-588.

Autschbach, F., T. Giese, N. Gassler, B. Sido, G. Heuschen, U. Heuschen, I. Zuna, P. Schulz, H. Weckauf, I. Berger, H. F. Otto and S. C. Meuer (2002). "Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease." *Virchows Arch* **441**(5): 500-513.

Bain, C. C., C. L. Scott, H. Uronen-Hansson, S. Gudjonsson, O. Jansson, O. Grip, M. Williams, B. Malissen, W. W. Agace and A. M. Mowat (2013). "Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors." Mucosal Immunol **6**(3): 498-510.

Balashov, K. E., D. R. Smith, S. J. Khoury, D. A. Hafler and H. L. Weiner (1997). "Increased interleukin 12 production in progressive multiple sclerosis: induction by activated CD4+ T cells via CD40 ligand." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 599-603.

Ban, H., A. Andoh, M. Shioya, A. Nishida, T. Tsujikawa and Y. Fujiyama (2008). "Increased number of FoxP3+CD4+ regulatory T cells in inflammatory bowel disease." Mol Med Rep **1**(5): 647-650.

Banerjee, A. K. (1991). "Sir Samuel Wilks: a founding father of clinical science." J R Soc Med **84**(1): 44-45.

Baumgart, D. C. (2008). "What's new in inflammatory bowel disease in 2008?" World J Gastroenterol **14**(3): 329-330.

Baumgart, D. C. and S. R. Carding (2007). "Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology." Lancet **369**(9573): 1627-1640.

Belperio, J. A., M. Dy, L. Murray, M. D. Burdick, Y. Y. Xue, R. M. Strieter and M. P. Keane (2004). "The role of the Th2 CC chemokine ligand CCL17 in pulmonary fibrosis." J Immunol **173**(7): 4692-4698.

Bergeron, V., V. Grondin, S. Rajca, M. A. Maubert, B. Pigneur, G. Thomas, G. Trugnan, L. Beaugerie, J. Cosnes, J. Masliah, H. Sokol, P. Seksik and M. Bachelet (2012). "Current smoking differentially affects blood mononuclear cells from patients with Crohn's disease and ulcerative colitis: relevance to its adverse role in the disease." Inflamm Bowel Dis **18**(6): 1101-1111.

Berin, M. C. (2002). "The Role of TARC in the Pathogenesis of Allergic Asthma." Drug News Perspect **15**(1): 10-16.

Bernardini, G., J. Hedrick, S. Sozzani, W. Luini, G. Spinetti, M. Weiss, S. Menon, A. Zlotnik, A. Mantovani, A. Santoni and M. Napolitano (1998). "Identification of the CC chemokines TARC and macrophage inflammatory protein-1 beta as novel functional ligands for the CCR8 receptor." Eur J Immunol **28**(2): 582-588.

Bernardo, D. (2013). "Human intestinal dendritic cells as controllers of mucosal immunity." Rev Esp Enferm Dig **105**(5): 279-290.

Bernstein, C. N. and F. Shanahan (2008). "Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases." Gut **57**(9): 1185-1191.

Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-238.

Borriello, F., M. Longo, R. Spinelli, A. Pecoraro, F. Granata, R. I. Staiano, S. Loffredo, G. Spadaro, F. Beguinot, J. Schroeder and G. Marone (2015). "IL-3 synergises with basophil-derived IL-4 and IL-13 to promote the alternative activation of human monocytes." *Eur J Immunol* **45**(7): 2042-2051.

Bradley, J. R. (2008). "TNF-mediated inflammatory disease." *J Pathol* **214**(2): 149-160.

Brant, S. R. (2011). "Update on the heritability of inflammatory bowel disease: the importance of twin studies." *Inflamm Bowel Dis* **17**(1): 1-5.

Brattsand, R. and M. Linden (1996). "Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies." *Aliment Pharmacol Ther* **10 Suppl 2**: 81-90; discussion 91-82.

Cario, E. and D. K. Podolsky (2000). "Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease." *Infect Immun* **68**(12): 7010-7017.

Chassaing, B., O. Koren, J. K. Goodrich, A. C. Poole, S. Srinivasan, R. E. Ley and A. T. Gewirtz (2015). "Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome." *Nature* **519**(7541): 92-96.

Christensen, B. and D. T. Rubin (2016). "Understanding Endoscopic Disease Activity in IBD: How to Incorporate It into Practice." *Curr Gastroenterol Rep* **18**(1): 5.

Christophi, G. P., R. Rong, P. G. Holtzapple, P. T. Massa and S. K. Landas (2012). "Immune markers and differential signaling networks in ulcerative colitis and Crohn's disease." *Inflamm Bowel Dis* **18**(12): 2342-2356.

Colombel, J. F., W. J. Sandborn, P. Rutgeerts, R. Enns, S. B. Hanauer, R. Panaccione, S. Schreiber, D. Byczkowski, J. Li, J. D. Kent and P. F. Pollack (2007). "Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial." *Gastroenterology* **132**(1): 52-65.

Cosnes, J. (2004). "Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**(3): 481-496.

Cosnes, J., C. Gower-Rousseau, P. Seksik and A. Cortot (2011). "Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases." *Gastroenterology* **140**(6): 1785-1794.

Curtis, M. M. and S. S. Way (2009). "Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens." *Immunology* **126**(2): 177-185.

Darfeuille-Michaud, A., J. Boudeau, P. Bulois, C. Neut, A. L. Glasser, N. Barnich, M. A. Bringer, A. Swidsinski, L. Beaugerie and J. F. Colombel (2004). "High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease." *Gastroenterology* **127**(2): 412-421.

De Jager, P. L., D. Franchimont, A. Waliszewska, A. Bitton, A. Cohen, D. Langelier, J. Belaiche, S. Vermeire, L. Farwell, A. Goris, C. Libioulle, N. Jani, T. Dassopoulos, G. P. Bromfield, B. Dubois, J. H.

Cho, S. R. Brant, R. H. Duerr, H. Yang, J. I. Rotter, M. S. Silverberg, A. H. Steinhardt, M. J. Daly, D. K. Podolsky, E. Louis, D. A. Hafler, J. D. Rioux, I. B. D. G. C. Quebec and N. I. G. Consortium (2007). "The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases." Genes Immun **8**(5): 387-397.

de Sousa Abreu, R., L. O. Penalva, E. M. Marcotte and C. Vogel (2009). "Global signatures of protein and mRNA expression levels." Mol Biosyst **5**(12): 1512-1526.

Eastaff-Leung, N., N. Mabarrack, A. Barbour, A. Cummins and S. Barry (2010). "Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease." J Clin Immunol **30**(1): 80-89.

Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson and D. A. Relman (2005). "Diversity of the human intestinal microbial flora." Science **308**(5728): 1635-1638.

Ek, W. E., M. D'Amato and J. Halfvarson (2014). "The history of genetics in inflammatory bowel disease." Ann Gastroenterol **27**(4): 294-303.

el-Shabrawi, Y., C. Livir-Rallatos, W. Christen, S. Baltatzis and C. S. Foster (1998). "High levels of interleukin-12 in the aqueous humor and vitreous of patients with uveitis." Ophthalmology **105**(9): 1659-1663.

Fina, D. and F. Pallone (2008). "What is the role of cytokines and chemokines in IBD?" Inflamm Bowel Dis **14 Suppl 2**: S117-118.

Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol **4**(4): 330-336.

Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, L. M. Williams, J. L. Dooley, A. G. Farr and A. Y. Rudensky (2005). "Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3." Immunity **22**(3): 329-341.

Fort, M. M., A. Mozaffarian, A. G. Stover, S. Correia Jda, D. A. Johnson, R. T. Crane, R. J. Ulevitch, D. H. Persing, H. Bielefeldt-Ohmann, P. Probst, E. Jeffery, S. P. Fling and R. M. Hershberg (2005). "A synthetic TLR4 antagonist has anti-inflammatory effects in two murine models of inflammatory bowel disease." J Immunol **174**(10): 6416-6423.

Francescone, R., V. Hou and S. I. Grivnennikov (2015). "Cytokines, IBD, and colitis-associated cancer." Inflamm Bowel Dis **21**(2): 409-418.

Frank, D. N., C. E. Robertson, C. M. Hamm, Z. Kpadeh, T. Zhang, H. Chen, W. Zhu, R. B. Sartor, E. C. Boedeker, N. Harpaz, N. R. Pace and E. Li (2011). "Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases." Inflamm Bowel Dis **17**(1): 179-184.

Frank, D. N., A. L. St Amand, R. A. Feldman, E. C. Boedeker, N. Harpaz and N. R. Pace (2007). "Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(34): 13780-13785.

Fujisawa, T., M. Nagao, Y. Hiraguchi, H. Katsumata, H. Nishimori, K. Iguchi, Y. Kato, M. Higashiura, I. Ogawauchi and K. Tamaki (2009). "Serum measurement of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 in children with atopic dermatitis: elevated normal levels in infancy and age-specific analysis in atopic dermatitis." Pediatr Allergy Immunol **20**(7): 633-641.

Funderburg, N. T., S. R. Stubblefield Park, H. C. Sung, G. Hardy, B. Clagett, J. Ignatz-Hoover, C. V. Harding, P. Fu, J. A. Katz, M. M. Lederman and A. D. Levine (2013). "Circulating CD4(+) and CD8(+) T cells are activated in inflammatory bowel disease and are associated with plasma markers of inflammation." Immunology **140**(1): 87-97.

Furusawa, Y., Y. Obata, S. Fukuda, T. A. Endo, G. Nakato, D. Takahashi, Y. Nakanishi, C. Uetake, K. Kato, T. Kato, M. Takahashi, N. N. Fukuda, S. Murakami, E. Miyauchi, S. Hino, K. Atarashi, S. Onawa, Y. Fujimura, T. Lockett, J. M. Clarke, D. L. Topping, M. Tomita, S. Hori, O. Ohara, T. Morita, H. Koseki, J. Kikuchi, K. Honda, K. Hase and H. Ohno (2013). "Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells." Nature **504**(7480): 446-450.

Gad, M. (2005). "Regulatory T cells in experimental colitis." Curr Top Microbiol Immunol **293**: 179-208.

Gonzalo, J. A., Y. Pan, C. M. Lloyd, G. Q. Jia, G. Yu, B. Dussault, C. A. Powers, A. E. Proudfoot, A. J. Coyle, D. Gearing and J. C. Gutierrez-Ramos (1999). "Mouse monocyte-derived chemokine is involved in airway hyperreactivity and lung inflammation." J Immunol **163**(1): 403-411.

Gordon, H., F. Trier Moller, V. Andersen and M. Harbord (2015). "Heritability in inflammatory bowel disease: from the first twin study to genome-wide association studies." Inflamm Bowel Dis **21**(6): 1428-1434.

Gradel, K. O., H. L. Nielsen, H. C. Schonheyder, T. Ejlersen, B. Kristensen and H. Nielsen (2009). "Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis." Gastroenterology **137**(2): 495-501.

Grossman, W. J., J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson and T. J. Ley (2004). "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death." Immunity **21**(4): 589-601.

Gruber, L., S. Kisling, P. Lichti, F. P. Martin, S. May, M. Klingenspor, M. Lichtenegger, M. Rychlik and D. Haller (2013). "High fat diet accelerates pathogenesis of murine Crohn's disease-like ileitis independently of obesity." PLoS One **8**(8): e71661.

Halim, T. Y., Y. Y. Hwang, S. T. Scanlon, H. Zaghouni, N. Garbi, P. G. Fallon and A. N. McKenzie (2016). "Group 2 innate lymphoid cells license dendritic cells to potentiate memory TH2 cell responses." Nat Immunol **17**(1): 57-64.

Hanauer, S. B., B. G. Feagan, G. R. Lichtenstein, L. F. Mayer, S. Schreiber, J. F. Colombel, D. Rachmilewitz, D. C. Wolf, A. Olson, W. Bao, P. Rutgeerts and A. I. S. Group (2002). "Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial." Lancet **359**(9317): 1541-1549.

Hashimoto, D., J. Miller and M. Merad (2011). "Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo." Immunity **35**(3): 323-335.

Hausmann, M., S. Kiessling, S. Mestermann, G. Webb, T. Spottl, T. Andus, J. Scholmerich, H. Herfarth, K. Ray, W. Falk and G. Rogler (2002). "Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation." Gastroenterology **122**(7): 1987-2000.

Heiseke, A. F. (2012). "The role of CCL17 in murine experimental colitis" (Dissertation). Technische Universität München.

Heiseke, A. F., A. C. Faul, H. A. Lehr, I. Forster, R. M. Schmid, A. B. Krug and W. Reindl (2012). "CCL17 promotes intestinal inflammation in mice and counteracts regulatory T cell-mediated protection from colitis." Gastroenterology **142**(2): 335-345.

Heller, F., P. Florian, C. Bojarski, J. Richter, M. Christ, B. Hillenbrand, J. Mankertz, A. H. Gitter, N. Burgel, M. Fromm, M. Zeitz, I. Fuss, W. Strober and J. D. Schulzke (2005). "Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution." Gastroenterology **129**(2): 550-564.

Hold, G. L., M. Smith, C. Grange, E. R. Watt, E. M. El-Omar and I. Mukhopadhyaya (2014). "Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years?" World J Gastroenterol **20**(5): 1192-1210.

Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-1061.

Hou, J. K., B. Abraham and H. El-Serag (2011). "Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature." Am J Gastroenterol **106**(4): 563-573.

Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, C. S. Tripp, S. F. Wolf, A. O'Garra and K. M. Murphy (1993). "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages." Science **260**(5107): 547-549.

Hueber, W., B. E. Sands, S. Lewitzky, M. Vandemeulebroecke, W. Reinisch, P. D. Higgins, J. Wehkamp, B. G. Feagan, M. D. Yao, M. Karczewski, J. Karczewski, N. Pezous, S. Bek, G. Bruin, B. Mellgard, C. Berger, M. Londei, A. P. Bertolino, G. Tougas, S. P. Travis and G. Secukinumab in Crohn's Disease Study (2012). "Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial." Gut **61**(12): 1693-1700.

Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J. P. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J. F. Colombel, M. Sahbatou and G. Thomas (2001). "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease." Nature **411**(6837): 599-603.

Hung, T. V. and T. Suzuki (2016). "Dietary Fermentable Fiber Reduces Intestinal Barrier Defects and Inflammation in Colitic Mice." J Nutr **146**(10): 1970-1979.

Imai, T., M. Baba, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi and O. Yoshie (1997). "The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4." J Biol Chem **272**(23): 15036-15042.

Imai, T., M. Nagira, S. Takagi, M. Kakizaki, M. Nishimura, J. Wang, P. W. Gray, K. Matsushima and O. Yoshie (1999). "Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine." Int Immunol **11**(1): 81-88.

Imai, T., T. Yoshida, M. Baba, M. Nishimura, M. Kakizaki and O. Yoshie (1996). "Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector." J Biol Chem **271**(35): 21514-21521.

Inngjerdigen, M., B. Damaj and A. A. Maghazachi (2000). "Human NK cells express CC chemokine receptors 4 and 8 and respond to thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine, and I-309." J Immunol **164**(8): 4048-4054.

Ivanov, I., L. Frutos Rde, N. Manel, K. Yoshinaga, D. B. Rifkin, R. B. Sartor, B. B. Finlay and D. R. Littman (2008). "Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine." Cell Host Microbe **4**(4): 337-349.

Jakubzick, C., H. Wen, A. Matsukawa, M. Keller, S. L. Kunkel and C. M. Hogaboam (2004). "Role of CCR4 ligands, CCL17 and CCL22, during *Schistosoma mansoni* egg-induced pulmonary granuloma formation in mice." Am J Pathol **165**(4): 1211-1221.

Jiang, H., J. Przybyszewski, D. Mitra, C. Becker, B. Brehm-Stecher, A. Tentinger and R. S. MacDonald (2011). "Soy protein diet, but not *Lactobacillus rhamnosus* GG, decreases mucin-1, trefoil factor-3, and tumor necrosis factor-alpha in colon of dextran sodium sulfate-treated C57BL/6 mice." J Nutr **141**(7): 1239-1246.

Johansson, M. E. (2014). "Mucus layers in inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **20**(11): 2124-2131.

Joossens, M., G. Huys, M. Cnockaert, V. De Preter, K. Verbeke, P. Rutgeerts, P. Vandamme and S. Vermeire (2011). "Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives." Gut **60**(5): 631-637.

Jugde, F., M. Alizadeh, C. Boissier, D. Chantry, L. Siproudhis, S. Corbinais, E. Quelvennec, F. Dyard, J. P. Campion, M. Gosselin, J. F. Bretagne, G. Semana and D. Heresbach (2001). "Quantitation of chemokines (MDC, TARC) expression in mucosa from Crohn's disease and ulcerative colitis." Eur Cytokine Netw **12**(3): 468-477.

Jung, M. K., J. E. Kwak and E. C. Shin (2017). "IL-17A-Producing Foxp3(+) Regulatory T Cells and Human Diseases." Immune Netw **17**(5): 276-286.

Kai, Y., I. Takahashi, H. Ishikawa, T. Hiroi, T. Mizushima, C. Matsuda, D. Kishi, H. Hamada, H. Tamagawa, T. Ito, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, H. Matsuda and H. Kiyono (2005). "Colitis in mice lacking the common cytokine receptor gamma chain is mediated by IL-6-producing CD4+ T cells." Gastroenterology **128**(4): 922-934.

Kataoka, Y. (2014). "Thymus and activation-regulated chemokine as a clinical biomarker in atopic dermatitis." J Dermatol **41**(3): 221-229.

Katoh, S., K. Fukushima, N. Matsumoto, K. Matsumoto, K. Abe, N. Onai, K. Matsushima and S. Matsukura (2003). "Accumulation of CCR4-expressing CD4+ T cells and high concentration of its ligands (TARC and MDC) in bronchoalveolar lavage fluid of patients with eosinophilic pneumonia." Allergy **58**(6): 518-523.

Khanna, S. and P. K. Tosh (2014). "A clinician's primer on the role of the microbiome in human health and disease." Mayo Clin Proc **89**(1): 107-114.

Kitani, A. and L. Xu (2008). "Regulatory T cells and the induction of IL-17." Mucosal Immunol **1 Suppl 1**: S43-46.

Kolls, J. K. and A. Linden (2004). "Interleukin-17 family members and inflammation." Immunity **21**(4): 467-476.

Komatsu-Fujii, T., Y. Chinuki, H. Niihara, K. Hayashida, M. Ohta, R. Okazaki, S. Kaneko and E. Morita (2018). "The thymus and activation-regulated chemokine (TARC) level in serum at an early stage of a drug eruption is a prognostic biomarker of severity of systemic inflammation." Allergol Int **67**(1): 90-95.

Komine, M., T. Kakinuma, S. Kagami, Y. Hanakawa, K. Hashimoto and K. Tamaki (2005). "Mechanism of thymus- and activation-regulated chemokine (TARC)/CCL17 production and its modulation by roxithromycin." J Invest Dermatol **125**(3): 491-498.

Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.

Koussounadis, A., S. P. Langdon, I. H. Um, D. J. Harrison and V. A. Smith (2015). "Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system." Sci Rep **5**: 10775.

Koutroubakis, I. E. and I. G. Vlachonikolis (2000). "Appendectomy and the development of ulcerative colitis: results of a metaanalysis of published case-control studies." Am J Gastroenterol **95**(1): 171-176.

Kristensen, N. N., D. Brudzewsky, M. Gad and M. H. Claesson (2006). "Chemokines involved in protection from colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells." Inflamm Bowel Dis **12**(7): 612-618.

Kunkel, E. J., D. J. Campbell and E. C. Butcher (2003). "Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity." Microcirculation **10**(3-4): 313-323.

Kurose, K., Y. Ohue, H. Wada, S. Iida, T. Ishida, T. Kojima, T. Doi, S. Suzuki, M. Isobe, T. Funakoshi, K. Kakimi, H. Nishikawa, H. Uono, M. Oka, R. Ueda and E. Nakayama (2015). "Phase Ia Study of FoxP3+ CD4 Treg Depletion by Infusion of a Humanized Anti-CCR4 Antibody, KW-0761, in Cancer Patients." Clin Cancer Res **21**(19): 4327-4336.

Lamba, M. J., V. S. Tharayil and R. B. Geary (2017). "Editorial: inflammatory bowel disease risk reduction after migration - are early life events important?" Aliment Pharmacol Ther **45**(10): 1367-1368.

Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." J Exp Med **201**(2): 233-240.

Le Leu, R. K., G. P. Young, Y. Hu, J. Winter and M. A. Conlon (2013). "Dietary red meat aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice whereas resistant starch attenuates inflammation." Dig Dis Sci **58**(12): 3475-3482.

Lenschow, D. J., T. L. Walunas and J. A. Bluestone (1996). "CD28/B7 system of T cell costimulation." Annu Rev Immunol **14**: 233-258.

Lieberam, I. and I. Forster (1999). "The murine beta-chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4+ T cells." Eur J Immunol **29**(9): 2684-2694.

Lin, L., S. Nonoyama, A. Oshiba, Y. Kabasawa and S. Mizutani (2003). "TARC and MDC are produced by CD40 activated human B cells and are elevated in the sera of infantile atopic dermatitis patients." J Med Dent Sci **50**(1): 27-33.

Liu, C., X. Xia, W. Wu, R. Wu, M. Tang, T. Chen, F. Xu, Y. Cong, X. Xu and Z. Liu (2013). "Anti-tumour necrosis factor therapy enhances mucosal healing through down-regulation of interleukin-21 expression and T helper type 17 cell infiltration in Crohn's disease." Clin Exp Immunol **173**(1): 102-111.

Liu, J. Z., S. van Sommeren, H. Huang, S. C. Ng, R. Alberts, A. Takahashi, S. Ripke, J. C. Lee, L. Jostins, T. Shah, S. Abadian, J. H. Cheon, J. Cho, N. E. Daryani, L. Franke, Y. Fuyuno, A. Hart, R. C. Juyal, G. Juyal, W. H. Kim, A. P. Morris, H. Poustchi, W. G. Newman, V. Midha, T. R. Orchard, H. Vahedi, A. Sood, J. J. Sung, R. Malekzadeh, H. J. Westra, K. Yamazaki, S. K. Yang, C. International Multiple Sclerosis Genetics, I. B. D. G. C. International, J. C. Barrett, A. Franke, B. Z. Alizadeh, M. Parkes, K. T. B, M. J. Daly, M. Kubo, C. A. Anderson and R. K. Weersma (2015). "Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations." Nat Genet **47**(9): 979-986.

Liu, Y., P. Zhang, J. Li, A. B. Kulkarni, S. Perruche and W. Chen (2008). "A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells." Nat Immunol **9**(6): 632-640.

Liu, Z. G. (2005). "Molecular mechanism of TNF signaling and beyond." Cell Res **15**(1): 24-27.

Liu, Z. J., P. K. Yadav, J. L. Su, J. S. Wang and K. Fei (2009). "Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **15**(46): 5784-5788.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Loschko, J., H. A. Schreiber, G. J. Rieke, D. Esterhazy, M. M. Meredith, V. A. Pedicord, K. H. Yao, S. Caballero, E. G. Pamer, D. Mucida and M. C. Nussenzweig (2016). "Absence of MHC class II on cDCs results in microbial-dependent intestinal inflammation." J Exp Med **213**(4): 517-534.

Lu, T., X. Jiao, M. Si, P. He, J. Zou, S. Zhang and K. Zeng (2016). "The Correlation of Serums CCL11, CCL17, CCL26, and CCL27 and Disease Severity in Patients with Urticaria." Dis Markers **2016**: 1381760.

Maaser, C., E. Langholz, H. Gordon, J. Burisch, P. Ellul, V. Hernandez Ramirez, T. Karakan, K. H. Katsanos, E. Krustins, A. Levine, G. J. Mantzaris, C. O'Morain, E. Saritas Yuksel, H. Strid and V. Annesse (2016). "European Crohn's and Colitis Organisation Topical Review on environmental factors in IBD." J Crohns Colitis **11**(8): 905-920.

Mahid, S. S., K. S. Minor, R. E. Soto, C. A. Hornung and S. Galandiuk (2006). "Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis." Mayo Clin Proc **81**(11): 1462-1471.

Maloy, K. J., L. Salaun, R. Cahill, G. Dougan, N. J. Saunders and F. Powrie (2003). "CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms." J Exp Med **197**(1): 111-119.

Manichanh, C., L. Rigottier-Gois, E. Bonnaud, K. Gloux, E. Pelletier, L. Frangeul, R. Nalin, C. Jarrin, P. Chardon, P. Marteau, J. Roca and J. Dore (2006). "Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach." Gut **55**(2): 205-211.

Mannon, P. J., I. J. Fuss, L. Mayer, C. O. Elson, W. J. Sandborn, D. Present, B. Dolin, N. Goodman, C. Groden, R. L. Hornung, M. Quezado, Z. Yang, M. F. Neurath, J. Salfeld, G. M. Veldman, U. Schwertschlag, W. Strober and I. L. C. s. D. S. G. Anti (2004). "Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease." N Engl J Med **351**(20): 2069-2079.

Marwaha, A. K., N. J. Leung, A. N. McMurchy and M. K. Levings (2012). "TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic?" Front Immunol **3**: 129.

Matsuoka, K. and T. Kanai (2015). "The gut microbiota and inflammatory bowel disease." Semin Immunopathol **37**(1): 47-55.

Mayne, C. G. and C. B. Williams (2013). "Induced and natural regulatory T cells in the development of inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **19**(8): 1772-1788.

McGovern, D. P., S. Kugathasan and J. H. Cho (2015). "Genetics of Inflammatory Bowel Diseases." Gastroenterology **149**(5): 1163-1176.

McIlroy, A., G. Caron, S. Blanchard, I. Fremaux, D. Duluc, Y. Delneste, A. Chevailler and P. Jeannin (2006). "Histamine and prostaglandin E up-regulate the production of Th2-attracting chemokines (CCL17 and CCL22) and down-regulate IFN-gamma-induced CXCL10 production by immature human dendritic cells." Immunology **117**(4): 507-516.

Meconi, S., A. Vercellone, F. Levillain, B. Payre, T. Al Saati, F. Capilla, P. Desreumaux, A. Darfeuille-Michaud and F. Altare (2007). "Adherent-invasive Escherichia coli isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro." Cell Microbiol **9**(5): 1252-1261.

Mirkov, M. U., B. Verstockt and I. Cleynen (2017). "Genetics of inflammatory bowel disease: beyond NOD2." Lancet Gastroenterol Hepatol **2**(3): 224-234.

Miyazaki, Y., K. Unoura, T. Tateishi, T. Akashi, T. Takemura, M. Tomita, N. Inase and Y. Yoshizawa (2013). "Higher serum CCL17 may be a promising predictor of acute exacerbations in chronic hypersensitivity pneumonitis." Respir Res **14**: 57.

Molodecky, N. A., I. S. Soon, D. M. Rabi, W. A. Ghali, M. Ferris, G. Chernoff, E. I. Benchimol, R. Panaccione, S. Ghosh, H. W. Barkema and G. G. Kaplan (2012). "Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review." Gastroenterology **142**(1): 46-54 e42; quiz e30.

Moret, F. M., C. E. Hack, K. M. van der Wurff-Jacobs, W. de Jager, T. R. Radstake, F. P. Lafeber and J. A. van Roon (2013). "Intra-articular CD1c-expressing myeloid dendritic cells from rheumatoid arthritis patients express a unique set of T cell-attracting chemokines and spontaneously induce Th1, Th17 and Th2 cell activity." Arthritis Res Ther **15**(5): R155.

Morgan, X. C., T. L. Tickle, H. Sokol, D. Gevers, K. L. Devaney, D. V. Ward, J. A. Reyes, S. A. Shah, N. LeLeiko, S. B. Snapper, A. Bousvaros, J. Korzenik, B. E. Sands, R. J. Xavier and C. Huttenhower (2012). "Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment." Genome Biol **13**(9): R79.

Moriconi, F., D. Raddatz, N. A. Ho, S. Yeruva, J. Dudas and G. Ramadori (2007). "Quantitative gene expression of cytokines in peripheral blood leukocytes stimulated in vitro: modulation by the anti-tumor necrosis factor-alpha antibody infliximab and comparison with the mucosal cytokine expression in patients with ulcerative colitis." Transl Res **150**(4): 223-232.

Motulsky, H. (2013). "Multiple Comparisons Concepts". In Intuitive Biostatistics: A Nonmathematical Guide to Statistical Thinking (pp. 187-189). Oxford University Press Inc

Mukhopadhyay, I., R. Hansen, E. M. El-Omar and G. L. Hold (2012). "IBD-what role do Proteobacteria play?" Nat Rev Gastroenterol Hepatol **9**(4): 219-230.

Nakatani, T., Y. Kaburagi, Y. Shimada, M. Inaoki, K. Takehara, N. Mukaida and S. Sato (2001). "CCR4 memory CD4+ T lymphocytes are increased in peripheral blood and lesional skin from patients with atopic dermatitis." J Allergy Clin Immunol **107**(2): 353-358.

Nakazato, J., M. Kishida, R. Kuroiwa, J. Fujiwara, M. Shimoda and N. Shinomiya (2008). "Serum levels of Th2 chemokines, CCL17, CCL22, and CCL27, were the important markers of severity in infantile atopic dermatitis." *Pediatr Allergy Immunol* **19**(7): 605-613.

Ness, T. L., J. L. Ewing, C. M. Hogaboam and S. L. Kunkel (2006). "CCR4 is a key modulator of innate immune responses." *J Immunol* **177**(11): 7531-7539.

Ng, S. C., C. N. Bernstein, M. H. Vatn, P. L. Lakatos, E. V. Loftus, Jr., C. Tysk, C. O'Morain, B. Moum, J. F. Colombel, Epidemiology and D. Natural History Task Force of the International Organization of Inflammatory Bowel (2013). "Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease." *Gut* **62**(4): 630-649.

Nickerson, K. P. and C. McDonald (2012). "Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* adhesion is enhanced by exposure to the ubiquitous dietary polysaccharide maltodextrin." *PLoS One* **7**(12): e52132.

O'Connor, W., Jr., L. A. Zenewicz and R. A. Flavell (2010). "The dual nature of T(H)17 cells: shifting the focus to function." *Nat Immunol* **11**(6): 471-476.

Ogawa, A., A. Andoh, Y. Araki, T. Bamba and Y. Fujiyama (2004). "Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice." *Clin Immunol* **110**(1): 55-62.

Ogawa, K., H. Morito, A. Hasegawa, N. Daikoku, F. Miyagawa, A. Okazaki, T. Fukumoto, N. Kobayashi, T. Kasai, H. Watanabe, H. Sueki, M. Iijima, M. Tohyama, K. Hashimoto and H. Asada (2013). "Identification of thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) as a potential marker for early indication of disease and prediction of disease activity in drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS)/drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS)." *J Dermatol Sci* **69**(1): 38-43.

Ogawa, K., H. Morito, A. Hasegawa, F. Miyagawa, N. Kobayashi, H. Watanabe, H. Sueki, M. Tohyama, K. Hashimoto, Y. Kano, T. Shiohara, K. Ito, H. Fujita, M. Aihara and H. Asada (2014). "Elevated serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) relates to reactivation of human herpesvirus 6 in drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS)/drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS)." *Br J Dermatol* **171**(2): 425-427.

Ogura, Y., D. K. Bonen, N. Inohara, D. L. Nicolae, F. F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R. H. Duerr, J. P. Achkar, S. R. Brant, T. M. Bayless, B. S. Kirschner, S. B. Hanauer, G. Nunez and J. H. Cho (2001). "A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease." *Nature* **411**(6837): 603-606.

Ohnmacht, C., A. Pullner, S. B. King, I. Drexler, S. Meier, T. Brocker and D. Voehringer (2009). "Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity." *J Exp Med* **206**(3): 549-559.

Okamoto, H., K. Koizumi, H. Yamanaka, T. Saito and N. Kamatani (2003). "A role for TARC/CCL17, a CC chemokine, in systemic lupus erythematosus." *J Rheumatol* **30**(11): 2369-2373.

Ott, C., A. Taksas, F. Obermeier, E. Schnoy and M. Muller (2014). "Smoking increases the risk of extraintestinal manifestations in Crohn's disease." World J Gastroenterol **20**(34): 12269-12276.

Ott, S. J., M. Musfeldt, D. F. Wenderoth, J. Hampe, O. Brant, U. R. Folsch, K. N. Timmis and S. Schreiber (2004). "Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease." Gut **53**(5): 685-693.

Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed and M. J. Lenardo (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." Nat Immunol **8**(12): 1353-1362.

Papadakis, K. A. and S. R. Targan (2000). "The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation." Inflamm Bowel Dis **6**(4): 303-313.

Parkes, G. C., K. Whelan and J. O. Lindsay (2014). "Smoking in inflammatory bowel disease: impact on disease course and insights into the aetiology of its effect." J Crohns Colitis **8**(8): 717-725.

Penna, G., M. Vulcano, S. Sozzani and L. Adorini (2002). "Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells." Hum Immunol **63**(12): 1164-1171.

Perez, M. J., R. V. Martin, V. M. Trillo and R. G. Gande (2017). "Inflammatory Bowel Disease: new therapeutic options in the post anti-TNFalpha era." Curr Drug Metab **18**(7): 666-679.

Perros, F., H. C. Hoogsteden, A. J. Coyle, B. N. Lambrecht and H. Hammad (2009). "Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation." Allergy **64**(7): 995-1002.

Persson, E. K., C. L. Scott, A. M. Mowat and W. W. Agace (2013). "Dendritic cell subsets in the intestinal lamina propria: ontogeny and function." Eur J Immunol **43**(12): 3098-3107.

Peyrin-Biroulet, L. and M. Lemann (2011). "Review article: remission rates achievable by current therapies for inflammatory bowel disease." Aliment Pharmacol Ther **33**(8): 870-879.

Pierik, M., S. Joossens, K. Van Steen, N. Van Schuerbeek, R. Vlietinck, P. Rutgeerts and S. Vermeire (2006). "Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases." Inflamm Bowel Dis **12**(1): 1-8.

Podolsky, D. K. (2002). "The current future understanding of inflammatory bowel disease." Best Pract Res Clin Gastroenterol **16**(6): 933-943.

Pope, R. M. and S. Shahrara (2013). "Possible roles of IL-12-family cytokines in rheumatoid arthritis." Nat Rev Rheumatol **9**(4): 252-256.

Puleston, J., M. Cooper, S. Murch, K. Bid, S. Makh, P. Ashwood, A. H. Bingham, H. Green, P. Moss, A. Dhillon, R. Morris, S. Strobel, R. Gelinas, R. E. Pounder and A. Platt (2005). "A distinct subset of

chemokines dominates the mucosal chemokine response in inflammatory bowel disease." Aliment Pharmacol Ther **21**(2): 109-120.

Qin, J., R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K. S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, N. Pons, F. Levenez, T. Yamada, D. R. Mende, J. Li, J. Xu, S. Li, D. Li, J. Cao, B. Wang, H. Liang, H. Zheng, Y. Xie, J. Tap, P. Lepage, M. Bertalan, J. M. Batto, T. Hansen, D. Le Paslier, A. Linneberg, H. B. Nielsen, E. Pelletier, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, K. Turner, H. Zhu, C. Yu, S. Li, M. Jian, Y. Zhou, Y. Li, X. Zhang, S. Li, N. Qin, H. Yang, J. Wang, S. Brunak, J. Dore, F. Guarner, K. Kristiansen, O. Pedersen, J. Parkhill, J. Weissenbach, H. I. T. C. Meta, P. Bork, S. D. Ehrlich and J. Wang (2010). "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing." Nature **464**(7285): 59-65.

Radford-Smith, G. L., J. E. Edwards, D. M. Purdie, N. Pandeya, M. Watson, N. G. Martin, A. Green, B. Newman and T. H. Florin (2002). "Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease." Gut **51**(6): 808-813.

Radstake, T. R., R. van der Voort, M. ten Brummelhuis, M. de Waal Malefijt, M. Looman, C. G. Figdor, W. B. van den Berg, P. Barrera and G. J. Adema (2005). "Increased expression of CCL18, CCL19, and CCL17 by dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis, and regulation by Fc gamma receptors." Ann Rheum Dis **64**(3): 359-367.

Rakoff-Nahoum, S., L. Hao and R. Medzhitov (2006). "Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis." Immunity **25**(2): 319-329.

Rasmussen, R. (2001). "Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications". In S. Meuer, C. Wittwer and K.-I. Nakagawara (Eds.), Quantification on the LightCycler (pp. 21-34). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg

Raza, A. and M. T. Shata (2012). "Letter: pathogenicity of Th17 cells may differ in ulcerative colitis compared with Crohn's disease." Aliment Pharmacol Ther **36**(2): 204; author reply 205.

Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." Blood **90**(3): 909-928.

Rubio, M. T., T. K. Means, R. Chakraverty, J. Shaffer, Y. Fudaba, M. Chittenden, A. D. Luster and M. Sykes (2005). "Maturation of human monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) in the presence of prostaglandin E2 optimizes CD4 and CD8 T cell-mediated responses to protein antigens: role of PGE2 in chemokine and cytokine expression by MoDCs." Int Immunol **17**(12): 1561-1572.

Rutella, S. and F. Locatelli (2011). "Intestinal dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **17**(33): 3761-3775.

Rutgeerts, P., W. J. Sandborn, B. G. Feagan, W. Reinisch, A. Olson, J. Johanns, S. Travers, D. Rachmilewitz, S. B. Hanauer, G. R. Lichtenstein, W. J. de Villiers, D. Present, B. E. Sands and J. F. Colombel (2005). "Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis." N Engl J Med **353**(23): 2462-2476.

Saeki, H. and K. Tamaki (2006). "Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases." J Dermatol Sci **43**(2): 75-84.

Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli and A. Lanzavecchia (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." *J Exp Med* **182**(2): 389-400.

Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1999). "Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation." *J Exp Med* **189**(4): 611-614.

Sallusto, F., A. Lanzavecchia and C. R. Mackay (1998). "Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses." *Immunol Today* **19**(12): 568-574.

Sanchez de Medina, F., I. Romero-Calvo, C. Mascaraque and O. Martinez-Augustin (2014). "Intestinal inflammation and mucosal barrier function." *Inflamm Bowel Dis* **20**(12): 2394-2404.

Sandborn, W. J., C. Gasink, L. L. Gao, M. A. Blank, J. Johanns, C. Guzzo, B. E. Sands, S. B. Hanauer, S. Targan, P. Rutgeerts, S. Ghosh, W. J. de Villiers, R. Panaccione, G. Greenberg, S. Schreiber, S. Lichtiger, B. G. Feagan and C. S. Group (2012). "Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease." *N Engl J Med* **367**(16): 1519-1528.

Sandborn, W. J., G. van Assche, W. Reinisch, J. F. Colombel, G. D'Haens, D. C. Wolf, M. Kron, M. B. Tighe, A. Lazar and R. B. Thakkar (2012). "Adalimumab induces and maintains clinical remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis." *Gastroenterology* **142**(2): 257-265.

Scheerens, H., E. Hessel, R. de Waal-Malefyt, M. W. Leach and D. Rennick (2001). "Characterization of chemokines and chemokine receptors in two murine models of inflammatory bowel disease: IL-10^{-/-} mice and Rag-2^{-/-} mice reconstituted with CD4⁺CD45RB^{high} T cells." *Eur J Immunol* **31**(5): 1465-1474.

Schultz, C., F. M. Van Den Berg, F. W. Ten Kate, G. N. Tytgat and J. Dankert (1999). "The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls." *Gastroenterology* **117**(5): 1089-1097.

Segain, J. P., D. Raingeard de la Bletiere, A. Bourreille, V. Leray, N. Gervois, C. Rosales, L. Ferrier, C. Bonnet, H. M. Blottiere and J. P. Galmiche (2000). "Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease." *Gut* **47**(3): 397-403.

Segura, E. and J. A. Villadangos (2009). "Antigen presentation by dendritic cells in vivo." *Curr Opin Immunol* **21**(1): 105-110.

Sekiya, T., H. Yamada, M. Yamaguchi, K. Yamamoto, A. Ishii, O. Yoshie, Y. Sano, A. Morita, K. Matsushima and K. Hirai (2002). "Increased levels of a TH2-type CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) in serum and induced sputum of asthmatics." *Allergy* **57**(2): 173-177.

Shen, L., L. Su and J. R. Turner (2009). "Mechanisms and functional implications of intestinal barrier defects." *Dig Dis* **27**(4): 443-449.

Simpson, K. W., B. Dogan, M. Rishniw, R. E. Goldstein, S. Klaessig, P. L. McDonough, A. J. German, R. M. Yates, D. G. Russell, S. E. Johnson, D. E. Berg, J. Harel, G. Bruant, S. P. McDonough and Y. H. Schukken (2006). "Adherent and invasive *Escherichia coli* is associated with granulomatous colitis in boxer dogs." *Infect Immun* **74**(8): 4778-4792.

Skovdahl, H. K., A. Granlund, A. E. Ostvik, T. Bruland, I. Bakke, S. H. Torp, J. K. Damas and A. K. Sandvik (2015). "Expression of CCL20 and Its Corresponding Receptor CCR6 Is Enhanced in Active Inflammatory Bowel Disease, and TLR3 Mediates CCL20 Expression in Colonic Epithelial Cells." *PLoS One* **10**(11): e0141710.

Sokol, H., B. Pigneur, L. Watterlot, O. Lakhdari, L. G. Bermudez-Humaran, J. J. Gratadoux, S. Blugeon, C. Bridonneau, J. P. Furet, G. Corthier, C. Grangette, N. Vasequez, P. Pochart, G. Trugnan, G. Thomas, H. M. Blottiere, J. Dore, P. Marteau, P. Seksik and P. Langella (2008). "Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(43): 16731-16736.

Sokol, H., P. Seksik, L. Rigottier-Gois, C. Lay, P. Lepage, I. Podglajen, P. Marteau and J. Dore (2006). "Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease." *Inflamm Bowel Dis* **12**(2): 106-111.

Solari, R. and J. E. Pease (2015). "Targeting chemokine receptors in disease--a case study of CCR4." *Eur J Pharmacol* **763**(Pt B): 169-177.

Soumelis, V., P. A. Reche, H. Kanzler, W. Yuan, G. Edward, B. Homey, M. Gilliet, S. Ho, S. Antonenko, A. Lauerma, K. Smith, D. Gorman, S. Zurawski, J. Abrams, S. Menon, T. McClanahan, R. de Waal-Malefyt Rd, F. Bazan, R. A. Kastelein and Y. J. Liu (2002). "Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP." *Nat Immunol* **3**(7): 673-680.

Staples, K. J., T. S. Hinks, J. A. Ward, V. Gunn, C. Smith and R. Djukanovic (2012). "Phenotypic characterization of lung macrophages in asthmatic patients: overexpression of CCL17." *J Allergy Clin Immunol* **130**(6): 1404-1412 e1407.

Steinbach, E. C. and S. E. Plevy (2014). "The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD." *Inflamm Bowel Dis* **20**(1): 166-175.

Stock, P., O. Akbari, G. Berry, G. J. Freeman, R. H. Dekruyff and D. T. Umetsu (2004). "Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity." *Nat Immunol* **5**(11): 1149-1156.

Stutte, S., T. Quast, N. Gerbitzki, T. Savinko, N. Novak, J. Reifemberger, B. Homey, W. Kolanus, H. Alenius and I. Forster (2010). "Requirement of CCL17 for CCR7- and CXCR4-dependent migration of cutaneous dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(19): 8736-8741.

Sun, C. M., J. A. Hall, R. B. Blank, N. Bouladoux, M. Oukka, J. R. Mora and Y. Belkaid (2007). "Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid." *J Exp Med* **204**(8): 1775-1785.

Sun, L., C. He, L. Nair, J. Yeung and C. E. Egwuagu (2015). "Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease." Cytokine **75**(2): 249-255.

Swain, S. L., A. D. Weinberg, M. English and G. Huston (1990). "IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors." J Immunol **145**(11): 3796-3806.

Swidsinski, A., A. Ladhoff, A. Pernthaler, S. Swidsinski, V. Loening-Baucke, M. Ortner, J. Weber, U. Hoffmann, S. Schreiber, M. Dietel and H. Lochs (2002). "Mucosal flora in inflammatory bowel disease." Gastroenterology **122**(1): 44-54.

Swidsinski, A., J. Weber, V. Loening-Baucke, L. P. Hale and H. Lochs (2005). "Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease." J Clin Microbiol **43**(7): 3380-3389.

Takaishi, H., T. Matsuki, A. Nakazawa, T. Takada, S. Kado, T. Asahara, N. Kamada, A. Sakuraba, T. Yajima, H. Higuchi, N. Inoue, H. Ogata, Y. Iwao, K. Nomoto, R. Tanaka and T. Hibi (2008). "Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease." Int J Med Microbiol **298**(5-6): 463-472.

Tamoutounour, S., S. Henri, H. Lelouard, B. de Bovis, C. de Haar, C. J. van der Woude, A. M. Woltman, Y. Reyat, D. Bonnet, D. Sichien, C. C. Bain, A. M. Mowat, C. Reis e Sousa, L. F. Poulin, B. Malissen and M. Guilliams (2012). "CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis." Eur J Immunol **42**(12): 3150-3166.

Targan, S. R., B. Feagan, S. Vermeire, R. Panaccione, G. Y. Melmed, C. Landers, D. Li, C. Russell, R. Newmark, N. Zhang, Y. Chon, Y. H. Hsu, S. L. Lin and P. Klekotka (2016). "A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Study of Brodalumab in Patients With Moderate-to-Severe Crohn's Disease." Am J Gastroenterol **111**(11): 1599-1607.

Terada, N., T. Nomura, W. J. Kim, Y. Otsuka, R. Takahashi, H. Kishi, T. Yamashita, N. Sugawara, S. Fukuda, T. Ikeda-Ito and A. Konno (2001). "Expression of C-C chemokine TARC in human nasal mucosa and its regulation by cytokines." Clin Exp Allergy **31**(12): 1923-1931.

Teramoto, K., S. Miura, Y. Tsuzuki, R. Hokari, C. Watanabe, T. Inamura, T. Ogawa, N. Hosoe, H. Nagata, H. Ishii and T. Hibi (2005). "Increased lymphocyte trafficking to colonic microvessels is dependent on MAdCAM-1 and C-C chemokine mLARC/CCL20 in DSS-induced mice colitis." Clin Exp Immunol **139**(3): 421-428.

Thomas, C. W., G. M. Myhre, R. Tschumper, R. Sreekumar, D. Jelinek, D. J. McKean, J. J. Lipsky, W. J. Sandborn and L. J. Egan (2005). "Selective inhibition of inflammatory gene expression in activated T lymphocytes: a mechanism of immune suppression by thiopurines." J Pharmacol Exp Ther **312**(2): 537-545.

Thompson, A. I. and C. W. Lees (2011). "Genetics of ulcerative colitis." Inflamm Bowel Dis **17**(3): 831-848.

Torok, H. P., J. Glas, I. Endres, L. Tonenchi, M. Y. Teshome, M. Wetzke, W. Klein, P. Lohse, T. Ochsenkuhn, M. Folwaczny, B. Goke, C. Folwaczny, B. Muller-Myhsok and S. Brand (2009). "Epistasis between Toll-like receptor-9 polymorphisms and variants in NOD2 and IL23R modulates susceptibility to Crohn's disease." *Am J Gastroenterol* **104**(7): 1723-1733.

Uhlig, H. H., J. Coombes, C. Mottet, A. Izcue, C. Thompson, A. Fanger, A. Tannapfel, J. D. Fontenot, F. Ramsdell and F. Powrie (2006). "Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis." *J Immunol* **177**(9): 5852-5860.

Untergasser, A. (2008). "RNAprep - Trizol combined with Columns" *Untergasser's Lab*. (letzter Zugriff 08.05.2018) <http://untergasser.de/lab/protocols/rna_prep_comb_trizol_v1_0.htm>.

Varela, E., C. Manichanh, M. Gallart, A. Torrejon, N. Borrueal, F. Casellas, F. Guarner and M. Antolin (2013). "Colonisation by *Faecalibacterium prausnitzii* and maintenance of clinical remission in patients with ulcerative colitis." *Aliment Pharmacol Ther* **38**(2): 151-161.

Varona, R., V. Cadenas, J. Flores, A. C. Martinez and G. Marquez (2003). "CCR6 has a non-redundant role in the development of inflammatory bowel disease." *Eur J Immunol* **33**(10): 2937-2946.

Velikova, T., D. Kyurkchiev, Z. Spassova, I. Karakolev, E. Ivanova-Todorova, I. Altankova and S. Stanilova (2017). "Alterations in cytokine gene expression profile in colon mucosa of Inflammatory Bowel Disease patients on different therapeutic regimens." *Cytokine* **92**: 12-19.

Vestergaard, C., K. Bang, B. Gesser, H. Yoneyama, K. Matsushima and C. G. Larsen (2000). "A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin." *J Invest Dermatol* **115**(4): 640-646.

Viejo-Borbolla, A., A. P. Martin, L. R. Muniz, L. Shang, F. Marchesi, N. Thirunarayanan, N. Harpaz, R. A. Garcia, M. Apostolaki, G. C. Furtado, L. Mayer, G. Kollias, A. Alcami and S. A. Lira (2010). "Attenuation of TNF-driven murine ileitis by intestinal expression of the viral immunomodulator CrmD." *Mucosal Immunol* **3**(6): 633-644.

Voo, K. S., Y. H. Wang, F. R. Santori, C. Boggiano, Y. H. Wang, K. Arima, L. Bover, S. Hanabuchi, J. Khalili, E. Marinova, B. Zheng, D. R. Littman and Y. J. Liu (2009). "Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(12): 4793-4798.

Wagner, S. J., A. Schmidt, M. J. Effenberger, L. Gruber, J. Danier and D. Haller (2013). "Semisynthetic diet ameliorates Crohn's disease-like ileitis in TNFDeltaARE/WT mice through antigen-independent mechanisms of gluten." *Inflamm Bowel Dis* **19**(6): 1285-1294.

Walker, A. W., J. D. Sanderson, C. Churcher, G. C. Parkes, B. N. Hudspith, N. Rayment, J. Brostoff, J. Parkhill, G. Dougan and L. Petrovska (2011). "High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease." *BMC Microbiol* **11**: 7.

Wang, Y., X. P. Liu, Z. B. Zhao, J. H. Chen and C. G. Yu (2011). "Expression of CD4+ forkhead box P3 (FOXP3)+ regulatory T cells in inflammatory bowel disease." *J Dig Dis* **12**(4): 286-294.

Weaver, C. T., C. O. Elson, L. A. Fouser and J. K. Kolls (2013). "The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin." Annu Rev Pathol **8**: 477-512.

Weber, C., S. Meiler, Y. Doring, M. Koch, M. Drechsler, R. T. Megens, Z. Rowinska, K. Bidzhekov, C. Fecher, E. Ribechini, M. A. van Zandvoort, C. J. Binder, I. Jelinek, M. Hristov, L. Boon, S. Jung, T. Korn, M. B. Lutz, I. Forster, M. Zenke, T. Hieronymus, T. Junt and A. Zernecke (2011). "CCL17-expressing dendritic cells drive atherosclerosis by restraining regulatory T cell homeostasis in mice." J Clin Invest **121**(7): 2898-2910.

Wu, D. and S. N. Meydani (2008). "Age-associated changes in immune and inflammatory responses: impact of vitamin E intervention." J Leukoc Biol **84**(4): 900-914.

Xiao, T., H. Fujita, H. Saeki, H. Mitsui, M. Sugaya, Y. Tada, T. Kakinuma, H. Torii, K. Nakamura, A. Asahina and K. Tamaki (2003). "Thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) produced by mouse epidermal Langerhans cells is upregulated by TNF-alpha and IL-4 and downregulated by IFN-gamma." Cytokine **23**(4-5): 126-132.

Zenewicz, L. A., A. Antov and R. A. Flavell (2009). "CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease." Trends Mol Med **15**(5): 199-207.

Zhou, L., J. E. Lopes, M. M. Chong, Ivanov, II, R. Min, G. D. Victora, Y. Shen, J. Du, Y. P. Rubtsov, A. Y. Rudensky, S. F. Ziegler and D. R. Littman (2008). "TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function." Nature **453**(7192): 236-240.

Zhu, J. and W. E. Paul (2010). "Heterogeneity and plasticity of T helper cells." Cell Res **20**(1): 4-12.

Zigmond, E., C. Varol, J. Farache, E. Elmaliah, A. T. Satpathy, G. Friedlander, M. Mack, N. Shpigel, I. G. Boneca, K. M. Murphy, G. Shakhar, Z. Halpern and S. Jung (2012). "Ly6C hi monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells." Immunity **37**(6): 1076-1090.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich sehr herzlich bei **Prof. Dr. Anne Krug** dafür bedanken, dass sie mir diese Dissertation ermöglicht hat, mich mit ihrer Begeisterung für die experimentelle Forschung anstecken konnte und mir die Arbeit an diesem spannenden Projekt anvertraut hat. Ich bedanke mich für die intensive Betreuung, die anregenden Diskussionen und die stetige Förderung meiner wissenschaftlichen Ausbildung. Besonderen Dank möchte ich ihr dafür aussprechen, dass sie mir ermöglicht hat, meine Arbeit auf wissenschaftlichen Kongressen zu präsentieren und mir stets mein Bestes abverlangt hat.

Ich danke auch **Dr. Alexander Heiseke** sehr für die geduldige Einarbeitung, das Vertrauen in meine Fähigkeiten sowie seine wertvollen Anregungen, hilfreichen Ratschläge und die aufmunternden Worte in schwierigen Phasen der Arbeit.

Mein Dank gilt auch **Dr. Matthias Schiemann** und **Lynette Henkel** von der Flow Cytometry Unit des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der TU München. Mit ihrer großen fachlichen Expertise haben sie mir einen wichtigen Teil dieser Arbeit ermöglicht.

Einen besonderen Dank möchte ich **Dr. Ezgi Dursun** und **Dr. Anamarija Markota** aussprechen für ihre ständige Unterstützung und eine großartige Zeit im Labor und außerhalb davon.

Weiterhin danke ich **Dr. Katharina Eisenächer** für ihre wertvollen Ideen und technischen Hilfestellungen, **Dr. Andrea Musumeci** und **Mona Schmalz** für die gute und unterhaltsame Zusammenarbeit sowie **Yvonne Schäfer** und **Sylvia Alig** für ihre stets hilfsbereite Unterstützung.

Lebenslauf

Lisa Maria Jandl

geb. 02.08.1990 in Deggendorf

Schulische Ausbildung

2009 Abitur am Robert-Koch-Gymnasium Deggendorf (Note 1,0)

Akademische Ausbildung

2009-2016 Studium der Humanmedizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität München (Vorklinik)
und der Technischen Universität München (klinischer Abschnitt)

08/2011 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,5)

10/2015 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1)

11/2016 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1)

01/2017 Approbation als Ärztin

Herbst 2015-2016 Praktisches Jahr
1. Tertial: Innere Medizin (Klinikum Schwabing, München)
2. Tertial: Chirurgie (Klinikum Bogenhausen, München)
3. Tertial: Urologie (Klinikum rechts der Isar, München)

Dissertation

Seit 07/2013 Doktorarbeit bei Prof. Dr. Anne Krug, II. Medizinische Klinik,
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität, und Institut
für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München

2013-2014 Forschungs-Stipendium des Instituts für Immunologie

Kongressbeiträge und Publikationen

06/2014 Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft chronisch-
entzündliche Darmerkrankungen, Mainz, Vortrag

09/2014 14th International Symposium on Dendritic Cells, Tours,
Frankreich, Poster

2018 Manuskript: „Dietary iron depletion fails to protect against colitis“
Markota A., Heiseke A. F., Metzger R., Jandl L., Reindl W., Haller
D., Krug A. (eingereicht im Frühjahr 2018 bei Scientific Reports)

Weiterbildung zur Fachärztin für Urologie

Seit 07/2017 Assistenzärztin in der Abteilung für Urologie der Chirurgischen
Klinik München-Bogenhausen