Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie, Gastroenterologie,
Endokrinologie und Stoffwechsel
(Direktor: Prof. Dr. med. Bertram Wiedenmann)

HABILITATIONSSCHRIFT

Antigenpräsentation in der intestinalen Mukosa - Grundlage immunmodulatorischer Therapien bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

Innere Medizin

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Herrn Dr. med. Daniel C. Baumgart
aus Berlin

Eingereicht: Juli/2004

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Wolfgang F. Caspary
2. Prof. Dr. med. Torsten Kucharzik

Zusammenfassung

Die Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist bis heute ungeklärt. Sie beinhaltet eine unkontrollierte Aktivierung von immunologischen Effektorzellen durch antigenpräsentierende Zellen, wie zum Beispiel dendritische Zellen und intestinale Epithelzellen, die Antigene der luminalen Flora fehlerkennen und/oder falsch verarbeiten und den daraus resultierenden Gewebsschädigungsmechanismen.
Am Interleukin-2 defizienten Mausmodell der Colitis ulcerosa konnten wir zeigen, daß T-Zellen eine zentrale Rolle beim mukosalen Entzündungsprozeß bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und insbesondere bei Colitis ulcerosa spielen. So kann zum Beispiel im Tiermodell eine Colitis ulcerosa durch Injektion von T-Zellen aus kranken Tieren auf gesunde Kontrolltiere übertragen werden. T-Zellen gehören zu den wichtigsten Produzenten pro-inflammatorischer Zytokine. Das Ausbleiben der Darmentzündung bei keimfrei gehaltenen Interleukin-2 defizienten Mäusen stützt die Hypothese einer Fehlaktivierung von T-Zellen durch luminale Antigene.
In weiterführenden Experimenten haben wir den Beweis erbracht, daß primäre mukosale Epithelzellen das Potential zur Antigenpräsentation besitzen. Ihre Funktion besteht jedoch offenbar in der aktiven, reversiblen Hemmung von CD4+ T-Zellantworten. Da sie in unmittelbarem Kontakt mit den luminalen Antigenen stehen, kommt ihnen zumindest im Kolon eine regulatorische, tolerogene Rolle zu. Eine Störung dieses Prozesses trägt möglicherweise zur Ausbildung und Aufrechterhaltung unkontrollierter Entzündung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und insbesondere bei Colitis ulcerosa bei.
Dendritische Zellen sind die am längsten bekannten und potentesten antigenpräsentierenden Zellen. Wir konnten zeigen, daß bei Patienten in Remission bereits ein Mangel an zirkulierenden unreifen, d.h. potentiell tolerogenen, dendritischen Zellen besteht, der bei akuten Schüben stark zunimmt. Dendritische Zellen von Patienten reagieren auf mikrobielle Modellstimuli im Gegensatz zu dendritischen Zellen von Gesunden mit der Ausbildung eines aktivierten Phänotyps und der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine. Unsere Daten lassen vermuten, daß ihre tolerogene Rolle gestört ist und sie möglicherweise aktiv zum Entzündungsgeschehen durch eine Fehlreaktion auf die kommensale Flora beitragen.
Die klinische Relevanz der gestörten T-Zellaktivierung wird durch klinische Daten deutlich. Wir haben gezeigt, daß der T-Zellaktivierungshemmer Tacrolimus zur überbrückenden Therapie refraktärer chronisch entzündlicher Darmerkrankungen bis zum Wirkeintritt konventioneller Immunmodulatoren, wie zum Beispiel Azathioprin oder 6-Mercaptopurin, zur raschen Induktion einer Remission und auch bei Therapieversagen konventioneller Immunmodulatoren geeignet ist. Weiterhin demonstrierten wir seine Wirksamkeit bei refraktären extraintestinalen Komplikationen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, wie dem Pyoderma gangrenosum.

Abstract

The etiology of inflammatory bowel disease is still unknown. Patients with inflammatory bowel disease have an inappropriate T-cell response to antigenic components of their indigenous gut flora and/or food stream. This breakdown in "oral tolerance" is poorly understood. However, this phenomenon likely relates to how antigen presenting cells, such as dendritic cells and epithelial cells, process and present antigen(s) to T-cells.

Our data in the interleukin-2 knock out mouse model of ulcerative colitis underscores the central role of T-cells for the inflammatory process in inflammatory bowel disease and particularly ulcerative colitis. Adoptive transfer experiments showed that T-cells from diseases animals can transmit the ulcerative like disease onto healthy controls. T-cells are among the main producers of pro-inflammatory cytokines. The absence of the ulcerative colitis like disease in gnotobiotic interleukin-2 mice supports the hypothesis of an inappropriate T-cell response towards the indigenous flora.

In additional studies we were able to show, that intestinal epithelial cells are capable to present antigen. However, their major role is apparently the reversible silencing of activated CD4+ T-cell responses. Their close proximity with luminal antigens suggest a regulatory, tolerogenic role at least in the colon. A disturbance of this process probably contributes to the occurrence and perpetuation of uncontrolled inflammation in inflammatory bowel disease and particularly UC.

Dendritic cells are the longest known most potent antigen presenting cells. We have demonstrated that inflammatory bowel disease patients lack circulating, immature, and thereby potentially tolerogenic dendritic cells. Cultured dendritic cells from inflammatory bowel disease patients showed a more vigorous response to microbial surrogate stimuli compared with healthy controls. Our data suggest that the normally tolerogenic role of circulating dendritic cells is impaired in inflammatory bowel disease patients. It appears that they actively contribute to the inflammatory process by a false response to the indigenous flora.

The clinical relevance of an uncontrolled T-cell activation is supported by our clinical data. We demonstrated that the T-cell activation inhibitor tacrolimus is suitable for the management of refractory inflammatory bowel disease. Low dose oral tacrolimus was also effective in refractory extraintestinal complications of inflammtory bowel disease such as pyoderma gangrenosum. The concepts and available data of current and evolving biologic therapies are extensively discussed.

Schlagwörter:

Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, T-Zellen, Epithelzellen, Dendritische Zellen, Antigenpräsentation, Immunmodulatoren

Keywords:

Crohn's disease, ulcerative colitis, T-cells, epithelial cells, dendritic cells, antigen presentation, immunomodulators

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung 2
Abstract 3
Abkürzungsverzeichnis 7
Vorwort 8
1 Einführung in die Thematik 9
2 Zusammenfassung der eigenen Arbeiten im wissenschaftlichen Kontext 11
2.1 Das Immunsystem 11
2.2 Das mukosale intestinale Immunsystem – Barrierefunktion und Toleranz (P1) 12
2.3 Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung – Schlüsselereignisse der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (P1, P2, P3) 13
2.3.1 Rolle von mukosalen Epithelzellen als atypische antigenpräsentierende Zellen bei der T-Zellaktivierung (P1, P4, P5, P6) 16
2.3.2 Rolle von dendritischen Zellen als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) bei der T-Zellaktivierung (P1, P7) 20
2.3.3 Klinische Beeinflussung der T-Zellaktivierung bei CED Patienten durch Tacrolimus und andere neue Immunmodulatoren und Biologika 22
3 Relevante eigene Originalarbeiten 25
Literaturverzeichnis 27
Danksagung 35
Eidesstattliche Versicherung 37
Anhang (Sonderdrucke eigener Originalarbeiten) 38

Widmung

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen präsentierende Zelle(n)
CARD-15	caspase activation and recruitment domain-15
CBA	cytometric bead array
CEC	Colonic epithelial cells
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung(en)
CTL	Zytotoxische T-Zelle
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CU	Colitis ulcerosa
DC	Dendritische Zelle(n)
DUNTL	DNA polymerase dUTP-digoxigenin nick translation labeling assay
EC	Epithelzelle(n)
FACS	fluorescence activated cell sorter, Flußzytometer
FITC	fluorescein isothiocyanate
IBD	inflammatory bowel disease(s)
IEL	Intraepitheliale(r) Lymphozyt(en) (T-Zelle)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
lacZ	Reporter Gen, das die Expression von β-Galaktosidase induziert
LP	Lamina propria
LPT	Lamina propria T-Zelle
MC	Morbus Crohn
MDC	Myeloide dendritische Zellen
MEI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NFκB	nuclear factor kappa B
NOD-2	nucleotide oligomerization domain-2
OVA	ovalbumin, Eialbumin
P	Nummer der zugrundeliegenden Publikation
PAMP	pathogen associated molecular pattern(s)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PDC	Plasmozytoide dendritische Zellen
PI	propidium iodide
SIEC	Small intestinal epithelial cells
SPF	specific pathogen free
TGF	transforming growth factor
T_H	T-Helfer Zelle
TLR	toll like receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
T_R	Regulatorische T-Zelle

Vorwort

Der einleitende Vorspann und die zugrundeliegenden, im Anhang eingebundenen Publikationen P1 bis P10 stellen die schriftliche Habilitationsleistung im Rahmen des kumulativen Habilitationsverfahrens gemäß der Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin (HabOMed), veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 02/1999, dar.

1 Einführung in die Thematik

Mehr als 300 000 Menschen in Deutschland leiden an den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa. Die Inzidenz und Prävalenz haben in den letzten zehn Jahren zugenommen, insbesondere für den M. Crohn [1,2,3]. Jeder fünfte CED Patient ist ein Kind oder Jugendlicher [4,5].

Trotz großer weltweiter Anstrengungen sind die genauen Ursachen beider Erkrankungen immer noch nicht endgültig geklärt [6]. Es ist jedoch generell akzeptiert, daß chronisch entzündliche Darmerkrankungen aus einer komplexen Störung der intestinalen Barriere und Fehlregulation des mukosalen Immunsystems resultieren, die durch endogene und exogene Faktoren bedingt sind [7].

Seit längerer Zeit wird eine endogene, genetische Disposition für CED vermutet [8]. Dies resultierte ursprünglich aus einer Reihe klinisch epidemiologischer Beobachtungen, wie einer familiären Häufung, einem gehäuften Auftreten bei monozygoten mehr als dizygoten Zwillingen, ethnischen Unterschieden bei Prävalenz und Inzidenz sowie der Assoziation von CED mit seltenen genetischen Erkrankungen, wie zum Beispiel Glykogenosen oder dem Wiskott-Aldrich Syndrom [9,10,11,11,12,13,14,15].

Die systematische Erforschung genetischer Faktoren gestaltet sich bei CED jedoch besonders schwierig, weil kein einfacher, den Mendelschen Gesetzen folgender Erbgang vorliegt. Vielmehr handelt sich um ein polygenetisches Geschehen, bei dem eine genetische Suszeptibilität mit spezifischen Mutationen verschiedener Gene vorliegt, die dann durch Umweltfaktoren schließlich bei einigen Menschen zur Erkrankung führt. Nach der vielbeachteten Entdeckung der Mutationen im NOD2/CARD15 Gen auf dem Locus IBD1 und deren Assoziation mit M. Crohn wurden in weiteren genomweiten Untersuchungen weitere sechs Suszeptibilitätsgene für CED identifiziert: 12q13-14 (IBD2), 6p13 (IBD3), 14q11-12 (IBD4), 5q31-33 (IBD5), 19p13 (IBD6) und 1p, 3p25-26 (IBD7) [16].

Die Daten aus den jüngsten Konkordanzanalysen, bei denen im günstigsten Fall eine Konkordanz von 58.3% für den Morbus Crohn und 18.2% für die Colitis ulcerosa bei monozygoten Zwillingen angegeben wurden, legen neben einer genetischen Prädisposition zusätzliche exogene Faktoren in der Pathogenese von CED nahe [17]. Aus epidemiologischen Untersuchungen sind geographische Unterschiede, wie das Nord-Süd- und ein Stadt-Land-Gefälle mit einer Häufung in den nördlichen

Breitengraden und in urbanisierten Regionen, ebenso, wie die jahreszeitlichen Schwankungen mit einer Häufung von Erkrankungsschüben in den Herbst- und Wintermonaten bekannt. Weiterhin gilt als gesichert, daß Tabakkonsum für die Colitis ulcerosa mit einer geringeren und für den Morbus Crohn einer höheren Erkrankungswahrscheinlichkeit verbunden ist [18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29].

Die zentrale Rolle bei den exogenen Faktoren nimmt jedoch die luminale Flora im Darm ein [30]. Die erfolgreiche klinische Anwendung von Antibiotika und Probiotika bei CED Patienten und Untersuchungen an zahlreichen Tiermodellen in keimfreier Umgebung unterstreichen die Bedeutung einer gestörten Reaktion des mukosalen Immunsystems auf die kommensale mikrobielle Flora bei genetisch suszeptiblen Individuen [31,32].

Diese fehlerhafte Interaktion wird auch unter dem Begriff einer gestörten oralen Toleranz zusammengefaßt. Sie beinhaltet eine unkontrollierte Aktivierung von immunologischen Effektorzellen, insbesondere den T_H-Zellen, durch antigenpräsentierende Zellen, wie dendritische Zellen und intestinale Epithelzellen, die antigene Bestandteile der luminalen Flora fehlerkennen und/oder falsch verarbeiten und den daraus resultierenden Gewebsschädigungsmechanismen [6,7,33].

Ein besseres Verständnis von Schlüsselereignissen der Entzündungskaskade, wie z.B. der Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen durch professionelle und atypische APC, hat in den letzen Jahren zur Entwicklung zahlreicher neuer immunmodulatorischer und biologischer Behandlungskonzepte geführt. In der Zukunft werden sich Möglichkeiten ergeben, selektivere therapeutische Strategien mit größerer Effektivität und günstigerem Nebenwirkungsprofil zu entwickeln [34]. Im folgenden werden die eigenen Beiträge zu dieser Thematik zusammengefaßt.

2 Zusammenfassung der eigenen Arbeiten im wissenschaftlichen Kontext

2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus einem komplexen Netzwerk verschiedener lymphatischer und nicht lymphatischer Zellpopulationen und humoraler Faktoren. Als Überwachungssystem ist seine wichtigste Aufgabe, Pathogene und andere Antigene zu erkennen, abzuwehren und zu eradizieren – also dem Organismus Immunität zu verleihen. Immunität kann grundsätzlich in angeborene und adaptive Reaktionen unterteilt werden. Angeborene Reaktionen werden durch Mastzellen, natürliche Killerzellen und mehr als 20 Serumglykoproteine, die auch als Komplementsystem bezeichnet werden, realisiert [35,36].

Angeborene Immunantworten werden über keimbahnkodierte Rezeptoren vermittelt. Da es im Genom nur eine begrenzte Zahl von Genen gibt, von denen nur ein Bruchteil zur Prägung des Immunsystems beiträgt, ist die Anzahl der so kodierten Rezeptoren sehr begrenzt. Mikroben dagegen sind sehr heterogen und mutieren schnell. Der dadurch scheinbar entstehende Mangel an Rezeptorvielfalt wird vom Organismus in sehr eleganter Weise kompensiert. Statt für jedes Antigen einen spezifischen Rezeptor vorzuhalten, erkennt das System grobe Muster von Pathogenen. Der angeborene Teil des Immunsystems kann also fremd und selbst durch Erkennung molekularer Muster sogenannte pathogen associated molecular pattern receptors (PAMP), die nur auf Mikroben und nicht dem Wirtsorganismus vorkommen, wie z.B. Lipopolysacchariden unterscheiden. Für chronische Entzündungsvorgänge, wie CED ist dabei der TLR-4 von besonderem Interesse, da über ihn NFκB, ein Schlüsselfaktor der Entzündung aktiviert werden kann [37,38,39].

Adaptive Immunantworten bedienen sich antigenspezifischer Rezeptoren auf T- und B-Zellen. Etwa 10^{14} bis 10^{18} B-Zell- und T-Zellrezeptoren werden somatisch kodiert und später rekombiniert, was dem adaptiven Teil des Immunsystems seine unglaubliche Vielfalt verleiht. Lymphozyten mit nützlichen Rezeptoren werden durch klonale Expansion nach Begegnung mit dem entsprechenden Antigen selektiert. Durch ihre zufällige genetische Rekombination besteht aber auch die Möglichkeit, daß Lymphozytenrezeptoren auch körpereigene Antigene oder Kommensalen fälschlich als fremd erkennen, was potentiell zu Autoimmunität und Entzündung führen kann.

Während B-Zellen Antigene direkt erkennen und so aktiviert werden können, erfordern T-Zellen die Präsentation von Antigenen durch spezialisierte Zellen (APCs). Der T-Zell-Rezeptor (TCR) erkennt spezifische Antigenfragmente nur im Kontext mit Histokompatibiltätsmolekülen (MHC I und II) und Kostimulationsmolekülen (CD40, CD80, CD86), an die sie nach intrazellulärer Verarbeitung in den APCs gekoppelt sind. Da die Antigenmengen und die Anzahl spezifischer T-Zellen üblicherweise sehr gering sind, kommt antigenpräsentierenden Zellen hier eine wichtige Vermittlerrolle zu [40,41,42,43,44,45,46].

Angeborene und adaptive Immunantworten können nur stattfinden, wenn die entsprechenden Zellpopulationen an den Wirkort gelangen. Dies geschieht durch Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle. Diese Botenstoffe werden nach Kontakt mit Antigenen, u.a. auch Mikroben gebildet. Leukozyten, die Rezeptoren für diese Mediatoren besitzen, migrieren dann so zum Ort des Geschehens. Mediatoren regulieren auch die Expression von Adhäsionsmolekülen, so daß Leukozyten adhärent werden und in die Gewebe eindringen.

2.2 Das mukosale intestinale Immunsystem – Barrierefunktion und Toleranz (P1)

Die mukosale Oberfläche stellt den physischen Kontakt des Immunsystems mit der Außenwelt her. Der Darm stellt den größten Anteil des Mukosa assoziierten lymphatischen Systems im Organismus dar. In der Darmmukosa gibt es mehr Lymphozyten als in jedem anderen lymphatischen Organ im Körper. Das lymphatische Gewebe der Mukosa umfaßt T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen und dendritische Zellen. Die T-Zellpopulation läßt sich in zwei Hauptgruppen unterteilen: intraepitheliale T-Zellen und Lamina propria T-Zellen. Die LP T-Zellen machen den größten Anteil aus und bestehen aus 95% αβ-T-Zellen, die wie im peripheren Blut auch in CD4+ und CD8+ T-Zellen untergliedert werden können. Intraepithelial dagegen finden sich vorwiegend γδ-CD8+ T-Zellen, die sich morphologisch und funktionell stark von den LP T-Zellen unterscheiden. Im Dünndarm gibt es Lymphozytencluster, die auch als Peyer'sche Plaques bezeichnet werden. Diesen Lymphozyten werden Antigene durch hochspezialisierte Epithelzellen, den sogenannten M-Zellen zugeführt und präsentiert [47,48].

Auf der anderen Seite findet sich im Darm die größte Population immunologisch äußerst diverser Mikroben (Kommensalen), unter ihnen mehr als 400 Bakterienspezies und andere luminale Antigene [49].
Der Kontrollmechanismus, der die im Normalfall kontrollierte Reaktion des Immunsystems auf luminale Antigene ermöglicht, d.h. eine kontinuierliche Entzündung im Darm verhindert, wird als (natürliche/orale) Toleranz bezeichnet [50]. Konzeptionell kann man ihn auch als intakte mukosale immunologische Barriere verstehen [51] .
Wir und andere Autoren haben gezeigt, daß Epithelzellen, T-Zellen und dendritische Zellen eine zentrale Rolle in diesem Prozeß spielen, und daß ein Zusammenbruch der Toleranz gegenüber der Darmflora ein entscheidender Schritt bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündung im Darm ist [52].

2.3 Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung – Schlüsselereignisse der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (P1, P2, P3)

Erste experimentelle Hinweise auf eine direkte Rolle von T-Zellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kamen von Experimenten an Organkulturen von fetalen Jejunumsegmenten, in denen eine Aktivierung von T-Zellen zu einer ausgeprägten Gewebsschädigung führte [53,54]. Daran schlossen sich eine Reihe von Untersuchungen an Tiermodellen, insbesondere transgenen Mäusen an, in denen lymphozytenspezifische Gene ausgeschaltet wurden (knock outs) und die dann spontan intestinale Läsionen entwickelten [33,55].
Eines dieser Tiermodelle ist die IL-2 defiziente Maus, die, wenn unter konventionellen Bedingungen gehalten eine komplexe Erkrankung mit einer Anämie, Lymphozytenhyperplasie, B-Zellmangel und einer gestörten Hämatopoese entwickelt. Erkrankte Tiere, die die ersten 8 Wochen überleben entwickeln eine chronische, nicht granulomatöse Entzündung der Kolonmukosa, ähnlich der humanen Colitis ulcerosa [56].
Die Notwendigkeit von T-Zellen für die Entstehung entzündlicher Läsionen am Kolon von IL-2 defizienten Mäusen wurde durch Kreuzung mit immundefizienten Mäusen, denen alle Lymphozyten (RAG-2 defiziente Mäuse) oder B-Zellen fehlen (Ig heavy chain J segment (JH) defiziente Mäuse) durch andere Autoren gezeigt [57]. Die Tatsache, daß JH / IL-2 defiziente Mäuse Colitis ulcerosa ähnliche Veränderungen

aufweisen und RAG-2 / IL-2 defiziente Mäuse keine CU ähnlichen Veränderungen haben zeigte, daß B-Zellen für die Pathogenese keine relevante Rolle spielen. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an der Darmmukosa der IL-2 defizienten Maus hatten Hinweise auf eine erhöhte zytotoxische Aktivität von Lamina propria T-Zellen erbracht. Ferner wurde in der Darmmukosa der IL-2 defizienten Maus und anderen CED Tiermodellen über eine vermehrte Expression von mRNA pro-inflammatorischer Zytokine, wie INFγ und TNFα, berichtet [55].

Wir wollten daher klären, welche Zellen die pro-inflammatorischen Zytokine produzieren, wie T-Zellen und Mukosaepithelzellen interagieren und wie die Gewebsschädigung zustande kommt sowie den Einfluß der kommensalen luminalen Flora bei der Entstehung der Entzündung weitergehend definieren.

Um die Hypothese zu prüfen, daß die CU ähnliche entzündliche Darmerkrankung bei IL-2 defizienten Mäusen tatsächlich auf eine unkontrollierte T-Zellantwort durch luminale Antigene hervorgerufen wird, wurde eine Kolonie unter keimfreien Bedingungen angezüchtet. Die Keimfreiheit wurde durch serologische, histopathologische und mikrobiologische Untersuchungen überwacht. Nach 8 bis 12 Wochen, dem üblichen Zeitpunkt des Auftretens erster Erkrankungszeichen bei konventionell (SPF) gehaltenen IL-2 defizienten Mäusen, konnten wir zwar einen deutlichen Größen- und Gewichtsunterschied im Vergleich zu Wildtypvergleichstieren feststellen, jedoch keine entzündlichen Darmveränderungen. Auch mehr als sechs Monate keimfrei gehaltene Tiere entwickelten keine entzündlichen Veränderungen. Diese Beobachtungen wurden durch histopathologische Untersuchungen an den später autopsierten Mäusen bestätigt. Die Tiere entwickelten jedoch alle anderen bekannten immunologischen und hämatopoetischen Auffälligkeiten der IL-2 defizienten Maus.

In weiteren Untersuchungen haben wir eine ausführliche FACS Phänotypisierung und Quantifizierung der T-Zellen im Kolon der konventionell gehaltenen IL-2 defizienten Mäuse vorgenommen. Im Entzündungsinfiltrat der Lamina propria von nur leicht erkrankten Tieren zeigte sich schon eine vierfach erhöhte Anzahl von CD4+ T-Zellen, die bei stärker erkrankten Tieren bis auf das Dreißigfache im Vergleich zu Wildtypvergleichstieren zunahm. Ähnliche, aber quantitativ geringere Veränderungen wurden auch bei den intraepithelialen Lymphozyten sowie für CD8+ T-Zellen beobachtet. Der Anteil von CD4+CD8+ T-Zellen hingegen war bei erkrankten und Wildtyptieren gleich.

Die zytotoxische Aktivität von T-Zellen aus dem entzündeten Kolon erkrankter IL-2 defizienter Mäuse als möglichen Mechanismus der Gewebsschädigung untersuchten wir in einem Standard CTL-Assay mit der etablierten Zielzellinie P815 bzw. frisch isolierten Kolonepithelzellen aus Wildtypvergleichstieren. Mit dem Nachweis zytolytischer Aktivität von T-Lymphozyten aus entzündeten Kolonabschnitten IL-2 defizienter Mäuse wurde ihr zytotoxisches Potential prinzipiell demonstriert. Im Anschluß wurden die Experimente mit frisch isolierten Kolonepithelzellen aus Wildtypmäusen wiederholt, um dies als möglichen Schädigungsmechanismus bei CED nachzuweisen oder auszuschließen. Weder eine T-Zellgesamtpopulation, noch einzelne Subpopulationen von CD4+ oder CD8+ T-Zellen aus entzündeten Darmabschnitten IL-2 defizienter Mäuse lysierten die Kolonepithelzellen. Damit konnten wir CTL-Aktivität als Schädigungsmechanismus sicher ausschließen.

Im nächsten Schritt wurde die Zytokinproduktion und -sekretion von T-Zellen mittels intrazellulärer Färbung und ELISA Messung in den Überständen untersucht. T-Zellen konnten hier als eindeutige Quelle der CED typischen Zytokine TNFα, IFNγ und IL-4 identifiziert werden. Bei den intraepithelialen Lymphozyten dominierten TNFα produzierende CD4+ und CD8+ T-Zellen, während in der Lamina propria alle Zytokine von CD4+ und CD8+ T-Zellen gebildet wurden. Es wurde eine schweregradabhängige Zunahme von TNFα, IFNγ und IL-4 Produktion und Sekretion dokumentiert. Im Gegensatz dazu war bei keimfrei gehaltenen IL-2 defizienten Mäusen keine Zytokinproduktion und Sekretion nachweisbar. Das unterstreicht erneut die Bedeutung enterischer, mikrobieller Antigene für die Entstehung und Aufrechterhaltung von intestinalen Entzündungsprozessen in diesem Tiermodell.

Um die Frage nach einer direkten Schädigung der Mukosaepithelzellen durch IFNγ und/oder TNFα zu beantworten, entwickelten wir ein neues Primärkultursystem mit dem ultimativ eine mehrwöchige Zellkultur von primären Kolonepithelzellen möglich wurde. Der epitheliale Ursprung der Zellen wurde durch Nachweis von Zytokeratin, Desmin sowie Muzin I und II bestätigt. Die Vitalität wurde durch Färbung mit Trypanblau, DUNTL-Assays und ^{3}H-Thymidin Inkorporation geprüft. Die biochemische Integrität wurde mit der Bestimmung von zytoplasmatischen und Bürstensaumenzymen bestätigt, wie alkalische Phosphatase und β-Galaktosidase. Schließlich wurde auch die Kontamination mit hämatopoetischen Zellen durch Färbung mit anti-CD45, anti-CD3 und B220 sowie mesenchymalen Zellen (Fibroblasten) mit anti-Vimentin evaluiert und Isolate mit mehr als 5% Verunreinigung durch nicht-

epitheliale Zellen verworfen. Das System wurde später auch für Dünndarmepithelzellen adaptiert.

In diesem System zeigten wir schließlich, daß sowohl TNFα, als auch IFNγ die Vitalität und metabolische Integrität von primär kultivierten Kolonepithelzellen nicht veränderte, jedoch bei der transformierten Kolonkarzinomzelllinie HT-29 Apoptose induzierten. Dieser von uns erstmalig beschriebene, wesentliche Unterschied zu bisherigen Arbeiten, in denen aufgrund der zytotoxischen Effekte beider Zytokine auf Tumorepithelzelllinien ein direkter gewebsschädigender Effekt dieser Zytokine postuliert wurde, unterstreicht die Problematik beim Arbeiten mit immortalen Zelllinien und der späteren Interpolation der Daten auf das humane System.

Zusammenfassend haben wir mit unseren Experimenten am IL-2 defizienten Mausmodell der Colitis ulcerosa gezeigt, daß T-Zellen eine zentrale Rolle beim mukosalen Entzündungsprozeß bei CED und insbesondere bei CU spielen. Sie sind in der Lage, die Erkrankung auf gesunde Wildtyptiere zu übertragen. T-Zellen gehören zu den wichtigsten Produzenten pro-inflammatorischer Zytokine in der erkrankten Mukosa. Die Zytokin-(Über)-Produktion erfordert die Präsenz der kommensalen Flora. Das Ausbleiben der Darmentzündung bei keimfrei gehaltenen IL-2 defizienten Mäusen stützt die Hypothese einer Fehlaktivierung von T-Zellen durch luminale Antigene. Während mukosale T-Zellen von IL-2 defizienten Mäusen zytolytisches Potential besitzen, spielt ihre CTL-Aktivität als Schädigungsmechanismus für Mukosaepithelzellen keine Rolle. Die Zytokine IFNγ und TNFα führen zu keiner direkten Schädigung des Mukosaepithels [58,59,60,61].

2.3.1 Rolle von mukosalen Epithelzellen als atypische antigenpräsentierende Zellen bei der T-Zellaktivierung (P1, P4, P5, P6)

Nachdem wir in unseren vorangegangenen Arbeiten die Schlüsselrolle der CD4+ T-Zellen für die Pathogenese der CED demonstriert hatten, interessierte uns die Frage, ob möglicherweise eine (fehlerhafte) Aktivierung durch atypische antigenpräsentierende Zellen, wie zum Beispiel Mukosaepithelzellen, die wie wir und andere zeigen konnten klassische und atypische MHC-II Moleküle exprimieren, ursächlich zugrunde liegt [62,63]. Dabei kam unser neu entwickeltes Modell zur Primärkultur von murinen mukosalen Epithelzellen erneut zum Einsatz.

Es war zunächst unser Ziel, die Fähigkeit von Dünn- und Dickdarmepithelzellen zur Antigenaufnahme, Antigenpräsentation und Aktivierung von CD4+ T-Zellen am Modell der IL-2 defizienten Maus und ihrem Wildtypäquivalent (C57/BL6) näher zu untersuchen.

Die Fähigkeit von Mukosaepithelzellen lösliche Proteinantigene aufzunehmen wurde mit dem Modellantigen Eialbumin (OVA) untersucht. Dafür wurden frisch isolierte Kolonepithelzellen mit FITC-markiertem OVA inkubiert. Das Färbemuster wurde mittels UV Mikroskopie und Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (MEI) in der Flußzytometrie (FACS) untersucht.

Wir konnten demonstrieren, daß metabolisch und morphologisch intakte Dünn- und Dickdarmepithelzellen in der Lage waren das Modellantigen OVA aufzunehmen. In weiterführenden Vergleichsstudien wurde das Antigenaufnahmeverhalten von Dünn- und Dickdarmepithelzellen, die aus den gleichen Tieren isoliert wurden, verglichen. Dabei zeigte sich ein deutlicher quantitativer Unterschied zugunsten der Dickdarmepithelzellen im Vergleich zu den Dünndarmepithelzellen.

Danach wurden die gleichen Experimente an den IL-2 defizienten Mäusen wiederholt. Die Kolonepithelzellen dieser erkrankten Tiere zeigten eine deutlich höhere Antigenaufnahme als die ihrer gesunden Artgenossen. Das gleiche Phänomen wurde interessanterweise am nicht entzündlich veränderten Dünndarm der erkrankten Tiere beobachtet.

Die Fähigkeit von mukosalen Epithelzellen zur MHC-II restringierten Präsentation eines Peptidantigens zur Aktivierung von CD4+ T-Zellen wurde mit Hilfe des hochsensitiven NFAT-lacZ-induzierbaren OVA-spezifischen Hybridoms KZO im nächsten Schritt untersucht. Mit diesem experimentellen Ansatz und anschließenden funktionellen Untersuchungen, konnten wir eine dosisabhängige, MHC-II restringierte CD4+ T-Zellaktivierung durch Dünn- und Dickdarmepithelzellen zeigen. In ihrer Potenz sind sie jedoch professionellen APC, wie mit einer Milzzellmischpopulation gezeigt, unterlegen. Im Einklang mit der zuvor dokumentierten effizienteren Antigenaufnahme durch Dickdarmepithelzellen aktivierten diese auch die CD4+ T-Zellen auf ein höheres Niveau als Dünndarmepithelzellen. Die stärkste CD4+ T-Zellaktivierung konnte für Dickdarmepithelzellen aus dem entzündeten Colon der IL-2 defizienten Mäuse gezeigt werden.

Im Anschluß galt es nun zu klären, ob die prinzipielle Fähigkeit von Kolonepithelzellen Antigene zu präsentieren auch zu einer vermehrten CD4+ T-Zellaktivierung oder aber,

wie für andere Epithelzellpopulationen gezeigt, zu einer Anergie von CD4+ T-Zellen, d.h. zur Induktion von T-Zelltoleranz führt.

Um diese Frage zu beantworten, kamen erneut C57BL6 Mäuse und jetzt auch transgene BALB/C-DO11.10 Mäuse, die einen OVA spezifischen T-Zellrezeptor überexprimieren zur Gewinnung antigenspezifischer CD4+ T-Zellen zum Einsatz. Damit sollte u. a. auch die Limitation der KZO CD4+ Hybridom-T-Zelllinie überwunden werden, die zu ihrer Aktivierung keine kostimulatorischen Signale benötigt, um die Rolle kostimulatorischer Moleküle auf Darmepithelzellen besser definieren zu können.

Zunächst wurde der Einfluß von atypischen APC (Kolonepithelzellen) im Vergleich zu professionellen APC (Makrophagen) auf die mitogeninduzierte Aktivierung CD4+ T-Zellen aus der Lamina propria und der Milz von C57BL6 Mäusen untersucht. Während Makrophagen erwartungsgemäß eine kräftige CD4+ T-Zellstimulation von sowohl LPT, als auch Milz CD4+ T-Zellen hervorrief, war diese Reaktion bei Kokultur mit den Kolonepithelzellen deutlich abgeschwächt. Außerdem war auch die Produktion und Konzentration von Zytokinen, wie IL-10, IL-5, IL-4, IFN-γ, und TNFα, wie mit intrazellulärer Färbung und direkter Messung in den Zellkulturüberständen gemessen, deutlich vermindert bzw. nicht nachweisbar.

Mit Hilfe der DO11.10 TCR transgenen Mäuse wurde im weiteren die antigenspezifische CD4+ T-Zellaktivierung untersucht. Im Gegensatz zu professionellen APC waren Kolonepithelzellen nicht in der Lage, DO11.10 CD4+ T-Zellen in der Gegenwart des spezifischen Antigens (OVA) zu aktivieren.

Da Kolonepithelzellen, wie oben ausgeführt, kostimulationsfrei die KZO CD4+ Hybridom-T-Ziellzellinie OVA spezifisch aktivieren konnten, vermuten wir, daß dies auf eine fehlende Expression von Kostimulationsmolekülen, wie bei anderen Epithelzellen beobachtet, zurückzuführen sei. Daher wurde eine Phänotypisierung der Kolonepithelzellen bezüglich der Expression von Kostimulationsmolekülen angeschlossen. Hier konnten wir auf Kolonepithelzellen ein vergleichbares Expressionsniveau für CD40 und CD80 sowie eine geringere Expression von CD86 und CD54 im Vergleich zu professionellen APC nachweisen. Die CD80 und CD86 Expression wurde zusätzlich durch RT-PCR und Southern Blot Analyse verifiziert.

Auch die exogene Zugabe von IL-2 oder die Kreuzvernetzung von CD28, mit denen sich bei professionellen APC eine induzierte Anergie durchbrechen läßt, konnten keine CD4+ T-Zellaktivierung durch Kolonepithelzellen herbeiführen. Kolonepithelzellen

waren darüber hinaus sogar in der Lage, in Gegenwart professioneller APC deren CD4+ T-Zellaktivierung zu hemmen.

Die Hemmung der CD4+ T-Zellhemmung wird nicht durch humorale Faktoren vermittelt, da Zellüberstände von Kolonepithelzellen die Aktivierung durch professionelle APC nicht hemmen konnten. Auch läßt sich dieser Effekt nicht durch die Produktion suppressiver Zytokine, wie IL-10, die Wirkung von CTLA-4 oder TGFβ oder die fehlende Expression von Kostimulationsmolekülen, wie CD80, CD86 oder MHC II erklären, wie wir in weiteren funktionellen Experimenten demonstrierten.

Abschließend wollten wir herausfinden, ob es sich bei der nun ausführlich dokumentierten Hemmung der CD4+ T-Zellaktivierung durch Kolonepithelzellen um ein reversibles Ereignis handelt. Hierfür wurden CD4+ T-Zellen aus Kokulturen mit Kolonepithelzellen oder professionellen APC gewonnen und erneut mit frisch isolierten professionellen APC durch PMA/Ionomycin oder anti-CD3 restimuliert. Dabei zeigten die aus Kolonepithelzellkokulturen wiedergewonnenen CD4+ T-Zellen eine kräftigere Antwort, als jene aus den Kokulturen mit professionellen APC. Die Induktion von Zelltod oder Apoptose in CD4+ T-Zellen wurde durch Annexin V und PI Färbung als Mechanismus ausgeschlossen. Auch die antigenspezifische CD4+ T-Zellsuppression war reversibel. Hierbei zeigten auch die aus Kolonepithelzellkokulturen wiedergewonnenen OVA spezifischen DO11.10 CD4+ T-Zellen die bereits für die nicht spezifischen CD4+ T-Zellen gefundene kräftigere Antwort im Vergleich zu jenen aus den Kokulturen mit professionellen APC.

Zusammenfassend haben wir mit diesen Experimenten den Beweis erbracht, daß primäre mukosale Epithelzellen über ihre Barriererolle hinaus direkt in Immunregulationsvorgänge in der Darmmukosa involviert sind. Obgleich sie das Potential zur Antigenpräsentation besitzen, besteht ihre Funktion offenbar in der aktiven, reversiblen Hemmung von CD4+ T-Zellantworten. Da sie in unmittelbarem Kontakt mit den luminalen Antigenen stehen, kommt ihnen zumindest im Kolon eine regulatorische, tolerogene Rolle zu, in der sie die Aktivierung von LP T-Zellen durch enterische Antigene verhindern. Eine Störung dieses Prozesses trägt möglicherweise zur Ausbildung und Aufrechterhaltung unkontrollierter Entzündung bei CED und insbesondere bei CU bei [59,62,64,65].

2.3.2 Rolle von dendritischen Zellen als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) bei der T-Zellaktivierung (P1, P7)

Dendritische Zellen sind die am längsten bekannten und potentesten APC [66]. Sie patrouillieren den Organismus praktisch ubiquitär, wobei sie begünstigt durch ihre Morphologie und damit verbundene große Zelloberfläche ständig Antigene „aufsammeln“ und migrieren „beladen“ schließlich zu lymphatischen Organen, wie Lymphknoten oder Milz, wo sie T-Zellen mit spezifischen TCR begegnen [67].

Unreife dendritische Zellen sind nach Meinung führender Autoren in der Lage, reaktive T-Zellklone auszulöschen und die Differenzierung naiver T-Zellen in regulatorische T-Zellen (TR) zu begünstigen, die wiederum anti-inflammatorische Zytokine wie TGFβ und IL-10 produzieren, welche antigenspezifische T-Zellen deaktivieren [68,69,70,71,72,73,74].

Im Gegensatz dazu führt die Reifung dendritischer Zellen nach Kontakt mit Mikroben oder pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNFα und IFNγ zu einem aktivierten Phänotyp mit erhöhter Expression kostimulatorischer Moleküle, wie CD80, CD86, CD40, CD83 und MHC-II, die die Proliferation antigenspezifischer T-Zellen und Immunität begünstigen [46,66,75,76,77].

Während zahlreiche Daten aus in vitro Experimenten und Tiermodellen zu einer Involvierung dendritischer Zellen in die Pathogenese von CED vorliegen, gibt es zu humanen DC bei CED nur sehr wenige Informationen [78,79,80,81]. Wir entschlossen uns daher zunächst alle drei derzeit bekannten zirkulierenden dendritischen Zellreihen (PDC, MDC-1 und MDC-2) zu charakterisieren. Dazu untersuchten wir Blutproben von 106 CED Patienten (57 CU n=57, MC n=49) und 19 gesunden Probanden.

Es wurde eine Phänotypisierung und Quantifizierung von PDC, MDC-1 und MDC-2 aus PBMC hinsichtlich bekannter Reifungs-, Aktivierungs- und Migrationsmarker mittels FACS vorgenommen. Die dabei erhobenen Daten wurden mit etablierten CED Erkrankungsindizes, wie dem Truelove-Witts Index für CU und dem Harvey-Bradshaw Index für MC in einer statistischen Regressionsanalyse korreliert. Unsere Ergebnisse zeigten, daß bereits CED Patienten in Remission weniger zirkulierende DC aufweisen als gesunde Probanden. Im akuten Schub kommt es zu einem sehr starken Abfall der zirkulierenden DC Populationen, die sehr eng mit Erkrankungsindizes korreliert. Zirkulierende DC zeigen einen unreifen Phänotyp und exprimieren Migrationsmarker, wie α4β7-Integrin und CD62L.

Im nächsten Schritt wurden aus dem Blut unbehandelter CED Patienten in Remission und im Schub hochreine PDC und MDC Populationen durch magnetische Zellsortierung gewonnen. Die dendritischen Zellen wurden danach kultiviert und mit mikrobiellen Modellstimuli der kommensalen Flora, wie LPS, das über TLR-4 mit MDC interagiert und CpG-ODN 2006, das über TLR-9 mit PDC interagiert, stimuliert [37,82]. So wollten wir die bei CED wahrscheinliche Interaktion dendritischer Zellen mit luminalen Mikrobiota simulieren, um daraus Rückschlüsse für die Reaktion der DC und ihren möglichen Einfluß auf die T-Zellaktivierung und Differenzierung zu gewinnen. Es wurde eine weiterreichende FACS Phänotypisierung der kultivierten Zellen und Analyse der in Kultur durch sie sezernierten Zytokine mittels CBA Multiplexanalyse vorgenommen. Wir fanden eine erhöhte Expression kostimulatorischer Moleküle bei unbehandelten CED Patienten im Schub, die nach Stimulation schneller und auf ein höheres Niveau anstieg, als bei gesunden Probanden. Darüber hinaus fand sich eine vermehrte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-6, IL-8 und TNFα bei MDC, die von CED Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden isoliert wurden. MDC von CED Patienten zeigten bereits eine deutlich höhere Zytokinproduktion als gesunde Kontrollen, die im Schub weiter anstieg. Am ausgeprägtesten waren die Unterschiede bei CU Patienten.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, daß bei CED Patienten in Remission bereits ein Mangel an zirkulierenden unreifen, d.h. potentiell tolerogenen dendritischen Zellen besteht, der bei akuten Schüben stark zunimmt. Die Expression von Migrationsmarkern deutet auf eine Migration in den Darm hin, was mit den Tierdaten anderer Autoren und unseren eigenen, vorläufigen Daten vereinbar ist. Weiterhin reagieren dendritische Zellen von CED Patienten auf mikrobielle Modellstimuli im Gegensatz zu gesunden DC mit der Ausbildung eines aktivierten Phänotyps und der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine. Die bisher vorliegenden Daten lassen vermuten, daß die normalerweise tolerogene Rolle von DC bei CED Patienten gestört ist und sie möglicherweise aktiv zum Entzündungsgeschehen durch eine Fehlreaktion auf die kommensale Flora beitragen. Weitere Arbeiten in unserem Labor werden sich der Klärung dieser Frage widmen [83].

2.3.3 Klinische Beeinflussung der T-Zellaktivierung bei CED Patienten durch Tacrolimus und andere neue Immunmodulatoren und Biologika (P8, P9, P10)

Etwa zwanzig Prozent aller Patienten mit schwerer Colitis ulcerosa sprechen nicht auf eine konventionelle Steroidtherapie an. Derzeitiger Therapiestandard für diese Patienten ist eine intravenöse Ciclosporin Behandlung, mit der sich in fünfzig bis neunzig Prozent der Fälle eine Remission erreichen läßt [84]. Langfristig sprechen 40 – 60% der Patienten auf diese Behandlung mit einer prolongierten Remission an [85]. Hypertonus, Nierenschäden, Hirsutismus sowie opportunistische Infektion sind häufige Nebenwirkungen einer solchen Behandlung [86]. Ein anderer Nachteil der Ciclosporin Behandlung ist die Notwendigkeit einer intravenösen Applikation, um aufgrund seiner variablen intestinalen Resorption zuverlässige Serumspiegel zu gewährleisten. Bei der neu auf den Markt gekommenen Mikroemulsion soll dieses Problem nicht mehr bestehen, jedoch gibt es erst wenige Daten dazu [87,88].

Wie oben ausführlich dargestellt, spielt die CD4+ T-Zellaktivierung eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen [7,59], so daß uns interessierte, einen anderen potenten T-Zellaktivierungshemmer auf seine Eignung zur Behandlung refraktärer CED Fälle zu untersuchen.

1987 haben Kino und Mitarbeiter erstmals Tacrolimus (FK506) aus *Streptomyces tsukubaensis* isoliert [89,90,91]. Es erinnert strukturell an Makrolide, wie Rapamycin, und stellte sich als potentes Immunsuppressivum heraus. Obwohl Tacrolimus sich strukturell komplett von Ciclosporin unterscheidet, ist es auch ein potenter Kalzineurin-Hemmer. Mögliche Angriffspunkte stellen Schlüsseltranskriptionsfaktoren der Entzündung, wie nuclear factor of activated T cells (NFAT) und nuclear factor kappa B (NF-κB) dar [92,93]. So kommt es zur Transkriptionshemmung des IL-2 Genes, welches für die T Zell Aktivierung notwendig ist.

Bis auf die Daten aus Tiermodellen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, wie der Peptidoglycan / Polysaccharid (PG/PS) induzierten Kolitis [94], der Dextransulfat (DSS) induzierten Colitis [95] und der Trinitrobenzensulfonsäure induzierten Kolitis [96,97], gab es nur sporadische Kasuistiken und Studien mit kleiner Fallzahl zur Anwendung von Tacrolimus bei Patienten mit therapierefraktären chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [98,99,100,101,102,103]. Ein Teil dieser Berichte beschreibt die erfolgreiche Anwendung von Tacrolimus bei Morbus Crohn Patienten, für die es aber schon eine Vielzahl innovativer, neuer Therapien, wie z.B. Infliximab

gibt [104]. Das Medikament wurde außerdem fast immer intravenös angewendet (insbesondere bei florider CU), was eine ambulante Betreuung der Patienten praktisch ausschließt.

In einer monozentrischen Studie untersuchten wir die Wirkung von Tacrolimus an 31 steroidabhängigen oder -refraktären CED Patienten. Als steroidabhängig wurden Patienten definiert, die mehr als 10 mg Prednisolon täglich oder dessen Äquivalentdosis zur Remissionserhaltung benötigten oder bei denen es innerhalb von sechs Monaten nicht gelang das Steroid auszuschleichen. Als steroidrefraktär wurden Patienten eingestuft, deren akute Erkrankungsphase auch mit systemischen Steroiddosen von mehr als 1 mg/kg Körpergewicht für mindestens 14 Tage nicht durchbrochen werden konnte. 28 Patienten (90.3%) sprachen auf die Behandlung an und 20 (64.5%) erreichten eine Remission. Lediglich drei Colitis ulcerosa Patienten (9.7%) mußten nach 1, 12 bzw. 24 Monaten kolektomiert werden. Mit der erstmals von uns verwendeten niedrigen Dosierung von 0.1 mg/kg KG lassen sich Serumzielspiegel zwischen 4 und 8 ng/ml erreichen, die zu deutlich weniger Nebenwirkungen (Kreatininanstieg (n=3, 9.7%), Tremor oder Parästhesien (n=3, 9.7%), Hyperkaliämie (n=1, 3.2%), Hypertonus (n=1, 3.2%) und opportunistische Infektion (n=1, 3.2%)) führen als in anderen Indikationen berichtet. In einer zweiten Studie konnten wir die Wirksamkeit von Tacrolimus bei refraktären extraintestinalen Komplikationen von CED demonstrieren. Mittlerweile haben wir mehr als 50 refraktäre CED Patienten mit niedrig dosiertem, oral applizierten Tacrolimus erfolgreich behandelt. Die Ansprechraten und Nebenwirkungen sind dabei unverändert geblieben [105,106].

Darüber hinaus gibt es eine Reihe weiterer therapeutischer Möglichkeiten zur Beeinflussung der T-Zellaktivierung und der aus ihr resultierenden Entzündung bei CED durch neue Immunmodulatoren und Biologika.

Die T-Zellaktivierung kann dabei durch Antikörper gegen T-Zellen (cM-T412, BF-5, MAX.16H5, Visilizumab) direkt blockiert werden.

Eine indirekte Hemmung der T-Zellaktivierung ist durch Inhibitoren pro-inflammatorischer Zytokine (Infliximab, Adalimumab, CDP-571, CDP-870, Etanercept, Onercept, Semapimod, Thalidomid, Fontolizumab, anti-IL12, anti-IL18, Daclizumab, Basiliximab) möglich.

Auch rekombinante anti-inflammatorische Zytokine (IL-10, IL-11, IFNa-2a, IFNb-1a), Inhibitoren der Zelladhäsion (Natalizumab, MLN-02, Alicaforsen) können zur Hemmung der T-Zellaktivierung eingesetzt werden.

Eine Beeinflussung der luminalen Flora durch Probiotika und Nahrungssupplemente (*Escherichia coli* Nissle 1917, *Lactobacillus spp*., *Saccharomyces boulardii* und *Trichuris suis*) beeinflußt die Antigenlast des Darminhaltes und somit indirekt auch die T-Zellaktivierung.

Wenn der Mukosaschaden bereits manifest ist, kann nur noch mit Wachstumsfaktoren (EGF, FGF-7, KGF-I und II, TFF Peptide, HGH, G-CSF, GM-CSF, Faktor XIII) die Restitution unterstützt werden.

Darüber hinaus gibt es noch andere Substanzen und Verfahren (CpG Oligodeoxynukleotide (ODN), Rosiglitazon, Zytapherese und Photopherese), die sich keiner der genannten Interventionsmöglichkeiten unterordnen lassen.

Die Konzepte und aktuellen Daten zu diesen Wirkstoffen haben wir in einer Publikation umfassend zusammengestellt und diskutiert [107].

Zusammenfassend haben wir gezeigt, daß der T-Zellaktivierungshemmer Tacrolimus in niedriger oraler Dosierung zur überbrückenden Therapie refraktärer CED vor Einleitung einer definitiven Remissionserhaltungstherapie geeignet ist. Weiterhin demonstrierten wir seine Wirksamkeit bei refraktären extraintestinalen CED Komplikationen. Aktuelle Konzepte und Daten weiterer Biologika, die ebenfalls direkt oder indirekt auf die T-Zellaktivierung wirken, haben wir in einer ausführlichen Übersicht zusammengefaßt [105,106,107].

3 Relevante eigene Originalarbeiten

P1 Baumgart, D. C. und Dignass, A. U. (2002): Intestinal barrier function, Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care 5 [6], Seite 685-694. URL: PM:12394645

P2 Contractor, N. V.; Bassiri, H.; Reya, T.; Park, A. Y.; Baumgart, D. C.; Wasik, M. A.; Emerson, S. G. und Carding, S. R. (1998): Lymphoid hyperplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice, J.Immunol. 160 [1], Seite 385-394. URL: PM:9551995

P3 Baumgart, D. C.; Olivier, W. A. ; Reya, T.; Peritt, D.; Rombeau, J. L. und Carding, S. R. (1998): Mechanisms of intestinal epithelial cell injury and colitis in interleukin 2 (IL2)-deficient mice, Cell Immunol. 187 [1], Seite 52-66. URL: PM:9682004

P4 Macartney, K. K.; Baumgart, D. C.; Carding, S. R.; Brubaker, J. O. und Offit, P. A. (2000): Primary murine small intestinal epithelial cells, maintained in long-term culture, are susceptible to rotavirus infection, J.Virol. 74 [12], Seite 5597-5603. URL: PM:10823867

P5 Baumgart, D. C.;* Telega, G. W.* und Carding, S. R. (2000): Uptake and presentation of antigen to T cells by primary colonic epithelial cells in normal and diseased states, Gastroenterology 119 [6], Seite 1548-1559. URL: PM:11113076

P6 Cruickshank, S. M.; McVay, L. D.; Baumgart, D. C.; Felsburg, P. J. und Carding, S. R. (2004): Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4+ T cell activation, Gut 53 [5], Seite 678-684. URL: PM:15082586

P7 Baumgart D. C.; Metzke, D.; Schmitz. J.; Scheffold, A.; Sturm, A.; Wiedenmann, B.; Dignass, A. U. (2004): Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid (PDC) and myeloid (MDC) dendritic cells, Gut 54 [2], Seite 228-236. URL: PM:15647187

---

* contributed equally.

P8 Baumgart, D. C.; Wiedenmann, B. und Dignass, A. U. (2003): Rescue therapy with tacrolimus is effective in patients with severe and refractory inflammatory bowel disease, Aliment.Pharmacol.Ther. 17 [10], Seite 1273-1281. URL: PM:12755840

P9 Baumgart, D. C.; Wiedenmann, B. und Dignass, A. U. (2004): Successful therapy of refractory pyoderma gangrenosum and periorbital phlegmona with tacrolimus (FK506) in ulcerative colitis, Inflam.Bowel.Dis. 10 [4], Seite 421-424. URL: PM:15475751

P10 Baumgart, D. C. und Dignass, A. U. (2004): Evolving biological therapies in inflammatory bowel disease, Curr.Pharm.Des. 10 [32], Seite 4127-4147. URL: ISI:15579093

Literaturverzeichnis

[1] Schölmerich, J. (2003): Inflammatory bowel disease, Endoscopy 35 [2], Seite 164-170. URL: PM:12561010

[2] Timmer, A. und Goebell, H. (1999): Incidence of ulcerative colitis, 1980-1995--a prospective study in an urban population in Germany, Z.Gastroenterol. 37 [11], Seite 1079-1084. URL: PM:10604221

[3] Timmer, A.; Breuer-Katschinski, B. und Goebell, H. (1999): Time trends in the incidence and disease location of Crohn's disease 1980-1995: a prospective analysis in an urban population in Germany, Inflamm.Bowel.Dis. 5 [2], Seite 79-84. URL: PM:10338375

[4] Griffiths, A. M. (2004): Specificities of inflammatory bowel disease in childhood, Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol. 18 [3], Seite 509-523. URL: PM:15157824

[5] Russell, R. K. und Satsangi, J. (2004): IBD: a family affair, Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol. 18 [3], Seite 525-539. URL: PM:15157825

[6] Blumberg, R. S. und Strober, W. (2001): Prospects for research in inflammatory bowel disease, JAMA 285 [5], Seite 643-647. URL: PM:11176874

[7] Podolsky, D. K. (2002): Inflammatory bowel disease, N.Engl.J.Med. 347 [6], Seite 417-429. URL: PM:12167685

[8] Hugot, J. P. (2004): Genetic origin of IBD, Inflamm.Bowel.Dis. 10 Suppl 1, Seite S11-S15. URL: PM:15168824

[9] Yamaguchi, T.; Ihara, K.; Matsumoto, T.; Tsutsumi, Y.; Nomura, A.; Ohga, S. und Hara, T. (2001): Inflammatory bowel disease-like colitis in glycogen storage disease type 1b, Inflamm.Bowel Dis. 7 [2], Seite 128-132. URL: PM:11383585

[10] Hsieh, K. H.; Chang, M. H.; Lee, C. Y. und Wang, C. Y. (1988): Wiskott-Aldrich syndrome and inflammatory bowel disease, Ann.Allergy 60 [5], Seite 429-431. URL: PM:3369753

[11] Binder, V. und Orholm, M. (1996): Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease, Neth.J.Med. 48 [2], Seite 53-56. URL: PM:8819799

[12] Kurata, J. H.; Kantor-Fish, S.; Frankl, H.; Godby, P. und Vadheim, C. M. (1992): Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization, Gastroenterology 102 [6], Seite 1940-1948. URL: PM:1587413

[13] Monsen, U. (1990): Inflammatory bowel disease. An epidemiological and genetic study, Acta Chir Scand.Suppl 559, Seite 1-42. URL: PM:2092567

[14] Monsen, U.; Bernell, O.; Johansson, C. und Hellers, G. (1991): Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease, Scand.J.Gastroenterol. 26 [3], Seite 302-306. URL: PM:1853152

[15] Tysk, C.; Lindberg, E.; Jarnerot, G. und Floderus-Myrhed, B. (1988): Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking, Gut 29 [7], Seite 990-996. URL: PM:3396969

[16] Cavanaugh, J. A. (2003): IBD International Genetics Consortium: international cooperation making sense of complex disease, Inflamm.Bowel.Dis. 9 [3], Seite 190-193. URL: PM:12792225

[17] Orholm, M.; Binder, V.; Sorensen, T. I.; Rasmussen, L. P. und Kyvik, K. O. (2000): Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study, Scand.J.Gastroenterol. 35 [10], Seite 1075-1081. URL: PM:11099061

[18] Blanchard, J. F.; Bernstein, C. N.; Wajda, A. und Rawsthorne, P. (2001): Small-area variations and sociodemographic correlates for the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis, Am.J.Epidemiol. 154 [4], Seite 328-335. URL: PM:11495856

[19] Boyko, E. J.; Koepsell, T. D.; Perera, D. R. und Inui, T. S. (1987): Risk of ulcerative colitis among former and current cigarette smokers, N.Engl.J.Med. 316 [12], Seite 707-710. URL: PM:3821808

[20] Calkins, B. M. (1989): A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease, Digestive Diseases & Sciences 34 [12], Seite 1841-1854. URL: PM:2598752

[21] Ekbom, A.; Helmick, C.; Zack, M. und Adami, H. O. (1991): The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden, Gastroenterology 100 [2], Seite 350-358. URL: PM:1985033

[22] Gilat, T. und Rozen, P. (1979): Epidemiology of Crohn's disease and ulcerative colitis: etiologic implications, Isr.J.Med.Sci. 15 [4], Seite 305-308. URL: PM:447495

[23] Kildebo, S.; Breckan, R.; Nordgaard, K.; Burhol, P. G. und Jorde, R. (1989): The incidence of Crohn's disease in northern Norway from 1983 to 1986. Northern Norway Gastroenterology Society, Scand.J.Gastroenterol. 24 [10], Seite 1265-1270. URL: PM:2690317

[24] Kyle, J. (1992): Crohn's disease in the northeastern and northern Isles of Scotland: an epidemiological review, Gastroenterology 103 [2], Seite 392-399. URL: PM:1634058

[25] Lashner, B. A.; Shaheen, N. J.; Hanauer, S. B. und Kirschner, B. S. (1993): Passive smoking is associated with an increased risk of developing inflammatory bowel disease in children, Am.J.Gastroenterol. 88 [3], Seite 356-359. URL: PM:8438840

[26] Loftus, E. V., Jr. und Sandborn, W. J. (2002): Epidemiology of inflammatory bowel disease, Gastroenterol.Clin.North Am. 31 [1], Seite 1-20. URL: PM:12122726

[27] Moum, B.; Aadland, E.; Ekbom, A. und Vatn, M. H. (1996): Seasonal variations in the onset of ulcerative colitis, Gut 38 [3], Seite 376-378. URL: PM:8675089

[28] Sandler, R. S. (1998): The incidence of IBD is higher in the North, Inflamm.Bowel.Dis. 4 [2], Seite 175-176. URL: PM:9687225

[29] Sonnenberg, A. (1988): Geographic and temporal variations of sugar and margarine consumption in relation to Crohn's disease, Digestion 41 [3], Seite 161-171. URL: PM:3265683

[30] Kraehenbuhl, J. P. und Corbett, M. (2004): Immunology. Keeping the gut microflora at bay, Science 303 [5664], Seite 1624-1625. URL: PM:15016988

[31] Elson, C. O. (2002): Genes, microbes, and T cells--new therapeutic targets in Crohn's disease, N.Engl.J.Med. 346 [8], Seite 614-616. URL: PM:11856802

[32] Sartor, R. B. (2004): Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics, Gastroenterology 126 [6], Seite 1620-1633. URL: PM:15168372

[33] Strober, W.; Fuss, I. J. und Blumberg, R. S. (2002): The immunology of mucosal models of inflammation, Annu.Rev.Immunol. 20, Seite 495-549. URL: PM:11861611

[34] Mayer, L. und Shao, L. (2004): Therapeutic potential of oral tolerance, Nat.Rev.Immunol. 4 [6], Seite 407-419. URL: PM:15173830

[35] Delves, P. J. und Roitt, I. M. (2000): The immune system. Second of two parts, N.Engl.J.Med. 343 [2], Seite 108-117. URL: PM:10891520

[36] Delves, P. J. und Roitt, I. M. (2000): The immune system. First of two parts, N.Engl.J.Med. 343 [1], Seite 37-49. URL: PM:10882768

[37] Krieg, A. M. (2002): CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects, Annu.Rev.Immunol. 20, Seite 709-760. URL: PM:11861616

[38] Hacker, G.; Redecke, V. und Hacker, H. (2002): Activation of the immune system by bacterial CpG-DNA, Immunology 105 [3], Seite 245-251. URL: PM:11918685

[39] Schreiber, S.; Nikolaus, S. und Hampe, J. (1998): Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease, Gut 42 [4], Seite 477-484. URL: PM:9616307

[40] Blumberg, R. S.; Lencer, W. I.; Zhu, X.; Kim, H. S.; Claypool, S.; Balk, S. P.; Saubermann, L. J. und Colgan, S. P. (1999): Antigen presentation by intestinal epithelial cells, Immunol.Lett. 69 [1], Seite 7-11. URL: PM:10436875

[41] Germain, R. N. und Jenkins, M. K. (2004): In vivo antigen presentation, Curr.Opin.Immunol. 16 [1], Seite 120-125. URL: PM:14734120

[42] Hudson, A. W. und Ploegh, H. L. (2002): The cell biology of antigen presentation, Exp.Cell Res. 272 [1], Seite 1-7. URL: PM:11740859

[43] Lauvau, G. und Glaichenhaus, N. (2004): Mini-review: Presentation of pathogen-derived antigens in vivo, Eur.J.Immunol. 34 [4], Seite 913-920. URL: PM:15048701

[44] Mitchison, N. A. (2004): T-cell-B-cell cooperation, Nat.Rev.Immunol. 4 [4], Seite 308-312. URL: PM:15057789

[45] Powrie, F. und Maloy, K. J. (2003): Immunology. Regulating the regulators, Science 299 [5609], Seite 1030-1031. URL: PM:12586934

[46] Shortman, K. und Heath, W. R. (2001): Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells, Nat.Immunol. 2 [11], Seite 988-989. URL: PM:11685217

[47] Wittig, B. M. und Zeitz, M. (2003): The gut as an organ of immunology, Int.J.Colorectal Dis. 18 [3], Seite 181-187. URL: PM:12673481

[48] Mowat, A. M.; Millington, O. R. und Chirdo, F. G. (2004): Anatomical and cellular basis of immunity and tolerance in the intestine, J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 39 Suppl 3, Seite S723-S724. URL: PM:15167360

[49] Hao, W. L. und Lee, Y. K. (2004): Microflora of the gastrointestinal tract: a review, Methods Mol.Biol. 268, Seite 491-502. URL: PM:15156063

[50] Garside, P. und Mowat, A. M. (2001): Oral tolerance, Semin.Immunol. 13 [3], Seite 177-185. URL: PM:11394960

[51] Baumgart, D. C. und Dignass, A. U. (2002): Intestinal barrier function, Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care 5 [6], Seite 685-694. URL: PM:12394645

[52] Shanahan, F. (2004): Host-flora interactions in inflammatory bowel disease, Inflamm.Bowel Dis. 10 Suppl 1, Seite S16-S24. URL: PM:15168825

[53] MacDonald, T. T. und Spencer, J. (1988): Evidence that activated mucosal T cells play a role in the pathogenesis of enteropathy in human small intestine, J.Exp.Med. 167 [4], Seite 1341-1349. URL: PM:2965735

[54] Evans, C. M.; Phillips, A. D.; Walker-Smith, J. A. und MacDonald, T. T. (1992): Activation of lamina propria T cells induces crypt epithelial proliferation and goblet cell depletion in cultured human fetal colon, Gut 33 [2], Seite 230-235. URL: PM:1541419

[55] Blumberg, R. S.; Saubermann, L. J. und Strober, W. (1999): Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease, Curr.Opin.Immunol. 11 [6], Seite 648-656. URL: PM:10631550

[56] Sadlack, B.; Merz, H.; Schorle, H.; Schimpl, A.; Feller, A. C. und Horak, I. (1993): Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene [see comments], Cell 75 [2], Seite 253-261.

[57] Ma, A.; Datta, M.; Margosian, E.; Chen, J. und Horak, I. (1995): T cells, but not B cells, are required for bowel inflammation in interleukin 2-deficient mice, J Exp Med 182 [5], Seite 1567-1572.

[58] Baumgart, D. C.; Rombeau, J. L. und Carding, S. R. (1997): Mechanisms of tissue injury in ulcerative colitis like disease in interleukin-2 deficient mice, Gastroenterology 112 [4], Seite A929-A929. URL: ISI:A1997WV41903703

[59] Baumgart, D. C.; McVay, L. D. und Carding, S. R. (1998): Mechanisms of immune cell-mediated tissue injury in inflammatory bowel disease (Review), Int.J.Mol.Med. 1 [2], Seite 315-332. URL: PM:9852233

[60] Baumgart, D. C.; Olivier, W. A.; Reya, T.; Peritt, D.; Rombeau, J. L. und Carding, S. R. (1998): Mechanisms of intestinal epithelial cell injury and colitis in interleukin 2 (IL2)-deficient mice, Cell Immunol. 187 [1], Seite 52-66. URL: PM:9682004

[61] Contractor, N. V.; Bassiri, H.; Reya, T.; Park, A. Y.; Baumgart, D. C.; Wasik, M. A.; Emerson, S. G. und Carding, S. R. (1998): Lymphoid hyperplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice, J.Immunol. 160 [1], Seite 385-394. URL: PM:9551995

[62] Baumgart, D. C.; Rombeau, J. L. und Carding, S. R. (1998): Antigen presentation capabilities of primary murine colonic epithelial cells, Gastroenterology 114 [4], Seite A928-A928. URL: ISI:000073089603779

[63] Blumberg, R. S. (1998): Current concepts in mucosal immunity. II. One size fits all: nonclassical MHC molecules fulfill multiple roles in epithelial cell function, Am.J.Physiol 274 [2 Pt 1], Seite G227-G231. URL: PM:9486173

[64] Macartney, K. K.; Baumgart, D. C.; Carding, S. R.; Brubaker, J. O. und Offit, P. A. (2000): Primary murine small intestinal epithelial cells, maintained in long-term culture, are susceptible to rotavirus infection, J.Virol. 74 [12], Seite 5597-5603. URL: PM:10823867

[65] Telega, G. W.; Baumgart, D. C. und Carding, S. R. (2000): Uptake and presentation of antigen to T cells by primary colonic epithelial cells in normal and diseased states, Gastroenterology 119 [6], Seite 1548-1559. URL: PM:11113076

[66] Mellman, I. und Steinman, R. M. (2001): Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines, Cell 106 [3], Seite 255-258. URL: PM:11509172

[67] Iwasaki, A. und Kelsall, B. L. (1999): Mucosal immunity and inflammation. I. Mucosal dendritic cells: their specialized role in initiating T cell responses, Am.J.Physiol 276 [5 Pt 1], Seite G1074-G1078. URL: PM:10329996

[68] Dhodapkar, M. V.; Steinman, R. M.; Krasovsky, J.; Munz, C. und Bhardwaj, N. (2001): Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells, J Exp.Med 193 [2], Seite 233-238. URL: PM:11208863

[69] Hawiger, D.; Inaba, K.; Dorsett, Y.; Guo, M.; Mahnke, K.; Rivera, M.; Ravetch, J. V.; Steinman, R. M. und Nussenzweig, M. C. (2001): Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo, J Exp.Med 194 [6], Seite 769-779. URL: PM:11560993

[70] Steinman, R. M. und Nussenzweig, M. C. (2002): Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99 [1], Seite 351-358. URL: PM:11773639

[71] Jonuleit, H.; Schmitt, E.; Schuler, G.; Knop, J. und Enk, A. H. (2000): Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells, J.Exp.Med. 192 [9], Seite 1213-1222. URL: PM:11067871

[72] Roncarolo, M. G.; Levings, M. K. und Traversari, C. (2001): Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells, J.Exp.Med. 193 [2], Seite F5-F9. URL: PM:11208869

[73] Schwartz, R. H. (2003): T cell anergy, Annu.Rev.Immunol. 21, Seite 305-334. URL: PM:12471050

[74] Viney, J. L.; Mowat, A. M.; O'Malley, J. M.; Williamson, E. und Fanger, N. A. (1998): Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance, J.Immunol. 160 [12], Seite 5815-5825. URL: PM:9637492

[75] Bell, S. J.; Rigby, R.; English, N.; Mann, S. D.; Knight, S. C.; Kamm, M. A. und Stagg, A. J. (2001): Migration and maturation of human colonic dendritic cells, J.Immunol. 166 [8], Seite 4958-4967. URL: PM:11290774

[76] Dhodapkar, M. V.; Steinman, R. M.; Sapp, M.; Desai, H.; Fossella, C.; Krasovsky, J.; Donahoe, S. M.; Dunbar, P. R.; Cerundolo, V.; Nixon, D. F. und Bhardwaj, N. (1999): Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells, J Clin.Invest 104 [2], Seite 173-180. URL: PM:10411546

[77] Stagg, A. J.; Hart, A. L.; Knight, S. C. und Kamm, M. A. (2003): The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria, Gut 52 [10], Seite 1522-1529. URL: PM:12970149

[78] Iwasaki, A. und Kelsall, B. L. (1999): Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells, J.Exp.Med. 190 [2], Seite 229-239. URL: PM:10432286

[79] Singh, B.; Read, S.; Asseman, C.; Malmstrom, V.; Mottet, C.; Stephens, L. A.; Stepankova, R.; Tlaskalova, H. und Powrie, F. (2001): Control of intestinal inflammation by regulatory T cells, Immunol.Rev. 182, Seite 190-200. URL: PM:11722634

[80] Malmstrom, V.; Shipton, D.; Singh, B.; Al-Shamkhani, A.; Puklavec, M. J.; Barclay, A. N. und Powrie, F. (2001): CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice, J.Immunol. 166 [11], Seite 6972-6981. URL: PM:11359859

[81] Ashcroft, A. J.; Cruickshank, S. M.; Croucher, P. I.; Perry, M. J.; Rollinson, S.; Lippitt, J. M.; Child, J. A.; Dunstan, C.; Felsburg, P. J.; Morgan, G. J. und Carding, S. R. (2003): Colonic dendritic cells, intestinal inflammation, and T cell-mediated bone destruction are modulated by recombinant osteoprotegerin, Immunity. 19 [6], Seite 849-861. URL: PM:14670302

[82] Krieg, A. M. (2003): CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?, Nat.Med. 9 [7], Seite 831-835. URL: PM:12835699

[83] Baumgart D. C.; Metzke, D.; Schmitz. J.; Scheffold, A.; Sturm, A.; Wiedenmann, B.; Dignass, A. U. (2004): Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid (PDC) and myeloid (MDC) dendritic cells, Gut 54 [2], Seite 228-236. URL: PM:15647187

[84] Sandborn, W. J. (2001): Cyclosporine in ulcerative colitis: state of the art, Acta Gastroenterol.Belg. 64 [2], Seite 201-204. URL: PM:11475136

[85] Hanauer, S. B. und Dassopoulos, T. (2001): Evolving treatment strategies for inflammatory bowel disease, Annu.Rev.Med. 52, Seite 299-318. URL: PM:11160781

[86] Marsh, J. W.; Vehe, K. L. und White, H. M. (1992): Immunosuppressants, Gastroenterol.Clin.North Am. 21 [3], Seite 679-693. URL: PM:1516962

[87] Latteri, M.; Angeloni, T. G.; Silveri, N. G.; Manna, R.; Gasbarrini, G. und Navarra, P. (2001): Pharmacokinetics of cyclosporin microemulsion in patients with inflammatory bowel disease, Clin.Pharmacokinet. 40 [6], Seite 473-483. URL: PM:11475470

[88] Navazo, L.; Salata, H.; Morales, S.; Dorta, M. C.; Perez, F.; de las, Casas D. und Aviles, J. (2001): Oral microemulsion cyclosporine in the treatment of steroid-refractory attacks of ulcerative and indeterminate colitis, Scand.J.Gastroenterol. 36 [6], Seite 610-614. URL: PM:11424319

[89] Goto, T.; Kino, T.; Hatanaka, H.; Nishiyama, M.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Aoki, H. und Imanaka, H. (1987): Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from Streptomyces tsukubaensis, Transplant.Proc. 19 [5 Suppl 6], Seite 4-8. URL: PM:2445072

[90] Kino, T.; Hatanaka, H.; Miyata, S.; Inamura, N.; Nishiyama, M.; Yajima, T.; Goto, T.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Aoki, H. und . (1987): FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro, J.Antibiot.(Tokyo) 40 [9], Seite 1256-1265. URL: PM:2445722

[91] Kino, T.; Hatanaka, H.; Hashimoto, M.; Nishiyama, M.; Goto, T.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Aoki, H. und Imanaka, H. (1987): FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics, J.Antibiot.(Tokyo) 40 [9], Seite 1249-1255. URL: PM:2445721

[92] Carballo, M.; Marquez, G.; Conde, M.; Martin-Nieto, J.; Monteseirin, J.; Conde, J.; Pintado, E. und Sobrino, F. (1999): Characterization of calcineurin in human neutrophils. Inhibitory effect of hydrogen peroxide on its enzyme activity and on NF-kappaB DNA binding, J.Biol.Chem. 274 [1], Seite 93-100. URL: PM:9867815

[93] Furuke, K.; Shiraishi, M.; Mostowski, H. S. und Bloom, E. T. (1999): Fas ligand induction in human NK cells is regulated by redox through a calcineurin-nuclear factors of activated T cell-dependent pathway, J.Immunol. 162 [4], Seite 1988-1993. URL: PM:9973469

[94] Aiko, S.; Conner, E. M.; Fuseler, J. A. und Grisham, M. B. (1997): Effects of cyclosporine or FK506 in chronic colitis, J.Pharmacol.Exp.Ther. 280 [2], Seite 1075-1084. URL: PM:9023326

[95] Takizawa, H.; Shintani, N.; Natsui, M.; Sasakawa, T.; Nakakubo, H.; Nakajima, T. und Asakura, H. (1995): Activated immunocompetent cells in rat colitis mucosa induced by dextran sulfate sodium and not complete but partial suppression of colitis by FK506, Digestion 56 [3], Seite 259-264. URL: PM:7544748

[96] Higa, A.; McKnight, G. W. und Wallace, J. L. (1993): Attenuation of epithelial injury in acute experimental colitis by immunomodulators, Eur.J.Pharmacol. 239 [1-3], Seite 171-176. URL: PM:7693488

[97] Hoshino, H.; Goto, H.; Sugiyama, S.; Hayakawa, T. und Ozawa, T. (1995): Effects of FK506 on an experimental model of colitis in rats, Aliment.Pharmacol.Ther. 9 [3], Seite 301-307. URL: PM:7544633

[98] Bousvaros, A.; Kirschner, B. S.; Werlin, S. L.; Parker-Hartigan, L.; Daum, F.; Freeman, K. B.; Balint, J. P.; Day, A. S.; Griffiths, A. M.; Zurakowski, D.; Ferry, G. D. und Leichtner, A. M. (2000): Oral tacrolimus treatment of severe colitis in children, J.Pediatr. 137 [6], Seite 794-799. URL: PM:11113835

[99] Bousvaros, A.; Wang, A. und Leichtner, A. M. (1996): Tacrolimus (FK-506) treatment of fulminant colitis in a child, J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 23 [3], Seite 329-333. URL: PM:8890089

[100] Lowry, P. W.; Weaver, A. L.; Tremaine, W. J. und Sandborn, W. J. (1999): Combination therapy with oral tacrolimus (FK506) and azathioprine or 6-mercaptopurine for treatment-refractory Crohn's disease perianal fistulae, Inflamm.Bowel.Dis. 5 [4], Seite 239-245. URL: PM:10579116

[101] Matsuhashi, N.; Nakajima, A.; Watanabe, K.; Komeno, Y.; Suzuki, A.; Ohnishi, S.; Omata, M.; Kondo, K.; Usui, Y.; Iwadare, J. I.; Watanabe, T.; Nagawa, H. und Muto, T. (2000): Tacrolimus in corticosteroid-resistant ulcerative colitis, J.Gastroenterol. 35 [8], Seite 635-640. URL: PM:10955604

[102] Sandborn, W. J.; Present, D. H.; Isaacs, K. L.; Wolf, D. C.; Greenberg, E.; Hanauer, S. B.; Feagan, B. G.; Johnson, T.; Joseph, G.; Martin, C. F. und Sandler, R. S. (2002): Tacrolimus (FK506) for the treatment of perianal and enterocutaneous fistulas in patients with Crohn's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial, Gastroenterology 122 [4], Seite 670. URL: ISI:000175366600405

[103] Fellermann, K.; Ludwig, D.; Stahl, M.; David-Walek, T. und Stange, E. F. (1998): Steroid-unresponsive acute attacks of inflammatory bowel disease: Immunomodulation by tacrolimus (FK506), American Journal of Gastroenterology 93 [10], Seite 1860-1866. URL: ISI:000076315900014

[104] Targan, S. R.; Hanauer, S. B.; van Deventer, S. J.; Mayer, L.; Present, D. H.; Braakman, T.; DeWoody, K. L.; Schaible, T. F. und Rutgeerts, P. J. (1997): A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group, N.Engl.J.Med. 337 [15], Seite 1029-1035. URL: PM:9321530

[105] Baumgart, D. C.; Wiedenmann, B. und Dignass, A. U. (2003): Rescue therapy with tacrolimus is effective in patients with severe and refractory inflammatory bowel disease, Aliment.Pharmacol.Ther. 17 [10], Seite 1273-1281. URL: PM:12755840

[106] Baumgart, D. C.; Wiedenmann, B. und Dignass, A. U. (2003): Rescue therapy with tacrolimus is effective in patients with severe and refractory inflammatory bowel disease, Aliment.Pharmacol.Ther. 17 [10], Seite 1273-1281. URL: PM:12755840

[107] Baumgart, D. C.; Wiedenmann, B. und Dignass, A. U. (2004): Successful therapy of refractory pyoderma gangrenosum and periorbital phlegmona with tacrolimus (FK506) in ulcerative colitis, Inflam.Bowel.Dis. 10 [4], Seite 421-424. URL: PM:15475751

Danksagung

Mein Dank gilt allen die mich bisher in meinem Leben gefördert und unterstützt haben.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Kurt Kochsiek, ehemals Direktor der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg, der mich für die Innere Medizin in ihrer Gesamtheit begeistert und meine Bewerbungen beim DAAD und der DFG unterstützt hat, danken.

Herr Prof. Dr. med. Wolfgang Scheppach, Leiter des Schwerpunktes Gastroenterologie der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg ist sowohl menschlich als auch als Kliniker und Wissenschaftler ein Vorbild für mich. Er hat das Interesse an der Gastroenterologie und den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in mir geweckt und mir sowohl bei der Wahl eines geeigneten Labors zur wissenschaftlichen Ausbildung als auch der unmittelbaren Knüpfung der Kontakte geholfen.

Herrn Prof. Dr. med. Herbert Lochs, Direktor der Medizinischen Klinik m.S. Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie und Stoffwechsel und Frau Dr. med. Helga Gerl, Oberärztin an der Medizinischen Klinik m.S. Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie und Stoffwechsel, möchte ich für die Unterstützung meines Stipendienantrages und die führende Hand bei meinen ersten Schritten auf dem Gebiet der Inneren Medizin danken.

John L. Rombeau, M.D., Professor of Surgery, University of Pennsylvania Medical Center hat mir nicht nur alle Ressourcen für meine wissenschaftliche Arbeit in Philadelphia zur Verfügung gestellt, sondern auch immer den Blick für wesentliche Fragestellungen und den ultimativen Bezug zum Patienten geschult. Simon R. Carding, Ph.D., Professor and Chair, Molecular Immunology, University of Leeds, England, UK, hat mich in Philadelphia mit viel Geduld an die Immunologie herangeführt und mich exakt wissenschaftlich denken und arbeiten gelehrt.

Stephen R. Mitchell, M.D., Joan St. Onge, M.D., Princy Kumar, M.D., Ronald S. Colson, M.D. und Paul Katz, M.D., Department of Medicine, der Georgetown University Medical Center, Washington, DC haben mir im International Faculty Development Program geholfen einen anderen Weg zugehen und mir als klinische Lehrer im legendären amerikanischen Ausbildungssystem zur Seite gestanden.

Herrn Prof. Dr. med. Bertram Wiedenmann, Direktor der Medizinischen Klinik m.S. Hepatologie, Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel, hat mich nach

meiner Rückkehr aus den USA in seine Klinik aufgenommen und mich seither in jeder Hinsicht bei meiner weiteren beruflichen Entwicklung unterstützt.

Besonderer Dank gilt meinem Arbeitsgruppenleiter und Freund, Herrn Prof. Dr. med. Axel U. Dignaß, Leitender Oberarzt der Medizinischen Klinik m. S. Hepatologie und Gastroenterologie, der mich rasch in seine Arbeitsgruppe integriert hat und mich seit jeher durch seine unkonventionelle, erfrischende Art menschlich und als Vorgesetzter motiviert, fordert und fördert.

Die vorliegenden wissenschaftlichen Arbeiten wären ohne die intellektuelle und praktische Mithilfe meiner Kollegen und Freunde in den Laboratorien und Kliniken in Philadelphia, PA, Washington, DC und Berlin nicht möglich gewesen. Insbesondere bin ich auch meiner MTLA, Frau Diana Metzke verpflichtet, die durch ihre sehr gute Auffassungsgabe und ihr überdurchschnittliches Engagement entscheidend zum Aufbau und der erfolgreichen Anwendung bewährter und neuer Methodik in Berlin beigetragen hat.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), dem Referat Forschung der Charité und der Eli & Edythe L. Broad Foundation, Los Angeles, California, USA danke ich für die großzügige finanzielle Unterstützung mit Stipendien und Sachbeihilfen.

Schließlich danke ich auch meinen Eltern, die mir über diese Rolle hinaus stets Vorbilder als Ärzte und Hochschullehrer an der Charité sind und denen ich diese Arbeit widme.

Eidesstattliche Versicherung

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;

- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,

- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

....

Berlin, den 27. Juli 2004 Dr. med. Daniel C. Baumgart

Anhang (Sonderdrucke eigener Originalarbeiten)

Aus lizenzrechtlichen Gründen darf diese Version der Habilitationsschrift die Sonderdrucke der Originalarbeiten nicht enthalten.