

Aus der Klinik für Innere Medizin m.S. Hepatologie und Gastroenterologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité  
- Universitätsmedizin Berlin

## HABILITATIONSSCHRIFT

**„Modulation intestinaler Wundheilungsvorgänge und Erhaltung der  
mukosalen Immunhomöostase  
- eine Untersuchung zur Regulation der intestinalen Barriere“**

Zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach  
Innere Medizin

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité  
- Universitätsmedizin Berlin

Dr. med. Andreas Sturm  
geboren am 29.08.1968 in Düsseldorf

Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen  
Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Wolfgang F. Caspary  
2. Prof. Dr. med. Jürgen Schölmerich

eingereicht am: 11.02.2004

## Abstrakt

Die intestinale Mukosa bildet eine biologisch wichtige Barriere zwischen dem Organismus und den schädigenden Faktoren im intestinalen Lumen. Diese komplexe Aufgabe wird durch eine hochdifferenzierte intestinale Mukosa bewältigt, die eine strukturelle sowie funktionelle intestinale Barriere bildet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeiten war, ausgewählte Aspekte der Regulations- und Reparaturmechanismen der intestinalen mukosalen Barriere weitergehend zu charakterisieren.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass das Phospholipid Lysophosphatidsäure (LPA) die intestinale epitheliale Zellmigration stimuliert, die dieser Zellen jedoch inhibiert. Die Modulation der intestinalen Wundheilung durch LPA erfolgt durch einen TGF- $\beta$  unabhängigen Mechanismus und wird über einen G-Protein abhängigen Rezeptor vermittelt, wie wir im Rahmen umfangreicher Untersuchungen zur Signaltransduktion unter Verwendung spezifischer Modulatoren der Signaltransduktion wie Bradykinin, Phorbol ester, Pertussistoxin, Suramin und neutralisierender TGF- $\beta$ -Antikörper belegen konnten.

In weiteren Experimenten konnten wir zeigen, dass LPA auch in-vivo einen wundheilungsfördernden Effekt besitzt. Die topische Applikation von LPA in diesem experimentellen Kolitismodell bewirkte einen geringeren Gewichtsverlust sowie ein geringeres Ausmaß an intestinaler Entzündung und Nekrose in-vivo. Diese Untersuchungen legen somit nahe, dass LPA die intestinale epitheliale Wundheilung durch eine Modulation der intestinalen epithelialen Migration und Proliferation durch TGF- $\beta$ -unabhängige Mechanismen stimuliert.

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit der funktionellen Charakterisierung von Lamina propria T-Zellen (LPT) und peripheren Blut T-Zellen (PBT). Wir konnten zeigen, dass der Zellzyklus von LPT distinkt von PBT reguliert wird. Hierbei spielt der Zellzyklusinhibitor p53 eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation von LPT. Um Autoimmunität zu verhindern, muss es nach einer Eliminierung des Antigens wieder zu einer Depletion des Pools an Effektor-T-Zellen durch die Aktivierung der Apoptose kommen. Wir konnten zeigen, dass beim Antigen-induzierten Zelltod von LPT der intrinsische Apoptoseweg aktiviert wird und Caspase-8 hierbei eine zentrale Rolle spielt. Physiologischerweise sind Zellzyklus und Apoptose eng miteinander verbunden. In weiteren Versuchen

konnten wir jedoch zeigen, dass dies nicht bei LPT der Fall ist und somit die von PBT distinkte Regulation von Zellzyklus und Apoptose mukosaler T-Zellen weiter unterstreichen.

Zusammengefasst konnten wir durch ausgewählte Untersuchungen zeigen, dass die intestinale Barriere und ihre funktionelle Beeinflussung eine wesentliche Rolle in der Pathogenese und Therapie intestinaler Entzündungen besitzt. Eine Beeinflussung intestinaler Reparaturprozesse und Modulation abnormer T-Zellen könnte neue Möglichkeiten in der Therapie intestinaler Entzündungen, wie z.B. chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bewirken.

Schlagwörter:

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen, intestinale Mucosabarriere, Lysophosphatidsäure, Lamina propria T-Zellen, periphere Blut T-Zellen, Zellzyklus, Apoptose, p53, Interleukin-8

**Abstract**

The intestinal mucosa protect the host from the potential harmful content of the intestinal lumen. To accomplish this difficult goal, the highly complex mucosa forms an anatomical as well as functional barrier to protect the organism.

In this work, we aimed to characterize distinct aspect of the intestinal barrier, focussing on distinct regulation and repair mechanism of the intestinal mucosa.

First, we demonstrate, that the phospholipid lysophosphatidic acid (LPA) stimulate the migration of intestinal epithelial cells, but, in contrast, inhibit their proliferation. This effect is mediated by G-protein receptors and is TGF- $\beta$ -independent, as we could demonstrate in further experiments using bradykinine, phorbol ester, pertussis toxin and suramine to modulate distinct signalling pathways.

We then demonstrated, using a well-established animal model of colitis, that LPA enhances intestinal wound healing in-vivo. In detail, the topical application of LPA in TNBS-treated rats reduced weight loss, ameliorate intestinal inflammation and prevented necrosis in the animals. This experiments demonstrate for the first time, that LPA modulates migration and proliferation of intestinal epithelial cells by distinct TGF- $\beta$  independent pathways.

Further experiments aimed to explore functional differences between peripheral blood (PBT) and mucosal T-cells (LPT). We demonstrated, that the cell cycle is distinctively regulated in PBT and LPT, identifying p53 as key regulator of LPT cell cycling. To avoid auto-immunity, the pool of effector T-cells must be depleted by apoptosis, once the antigen has been cleared. We demonstrate, that intrinsic pathway of apoptosis is activated during the antigen-induced cell death in LPT and that caspase-8 activity is required to execute LPT apoptosis.

Cell cycle and apoptosis are ultimately linked. However, as we show in further experiments, this is not the case in LPT, underlining the distinct regulation of LPT cell cycle and apoptosis.

In conclusion, using various distinct experimental tools, we demonstrate that the intestinal barrier itself and the modulation its function plays a fundamental role in the pathogenesis mucosal inflammation. The data presented in this work may therefore open new therapeutic options in the therapy of intestinal inflammatory disorders, such as inflammatory bowel diseases.

Keywords:

inflammatory bowel disease, intestinal barrier, lysophosphatidic acid, cell cycle, apoptosis, lamina propria T-cells, peripheral blood T-cells, interleukin-8, p53

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1 Problemstellung	8
1.2 Aufbau und Funktion der intestinalen Barriere	8
1.2.1 Die mukosale Epithelzellschicht	8
1.2.2 Das intestinale Immunsystem	9
1.3 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von Lamina propria T-Zellen	10
1.4 Orale Toleranz	11
1.5 Störungen der intestinalen Barriere am Beispiel von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	12
<b>2 Eigene Arbeiten</b>	<b>15</b>
2.1 Modulation der intestinalen Wundheilung durch Phospholipide	15
2.2 Untersuchungen zum Einfluss peripherer mononukleärer Blutzellen auf die intestinale epitheliale Wundheilung	17
2.3 Untersuchung zur Sekretion und Funktion von Interleukin 8 auf die intestinale Wundheilung	17
2.4 Untersuchungen zur Regulation des Zellzyklus von Lamina propria T-Zellen	18
2.5 Untersuchungen zur Rolle von Caspasen in der Regulation von Apoptose und Zellzyklus von Lamina prpria T-Zellen	19
2.6 Untersuchungen zur Rolle der Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ und HGF bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	19
<b>3 Relevante Originalarbeiten</b>	<b>21</b>
<b>4 Diskussion</b>	<b>22</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>29</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>33</b>
<b>Danksagung</b>	<b>46</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>48</b>
<b>Eidestättliche Erklärung</b>	<b>49</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

AICD	Antigen-induced cell death
CAM	Cell adhesion molecule
CD	Cluster of differentiation
CXCL8	Interleukin-8
CXCR1	Interleukin-8 Rezeptor 1
CXCR2	Interleukin-8 Rezeptor 2
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIMEC	Human intestinal microvascular endothelial cells
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IL	Interleukin
IFN- $\gamma$	Interferon Gamma
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule-1
LPA	Lysophosphatidsäure
LPT	Lamina propria T-Lymphozyten
LPS	Lipopolysaccharide
MALT	Mukosa associated lymphoid tissue
PBMNC	Peripheral blood mononuclear cells
PBT	Periphere Blut T-Lymphozyten
TCR	T-cell receptor
TGF- $\beta$	Transforming growth factor-beta
TNBS	Trinitrobenzon Salzsäure
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
VCAM-1	Vascular adhesion molecule-1

## **1 EINLEITUNG**

### **1.1 Problemstellung**

Die Grenzfläche der gastrointestinalen Mukosa stellt mit 200-400m<sup>2</sup> die größte Oberfläche dar, mit der der menschliche Organismus mit seiner Außenwelt in Kontakt steht [1]. Über diese Oberfläche muss sich der Mensch täglich nicht nur mit den Fremdstoffen der Nahrung auseinandersetzen, die aufzuspalten und zu prozessieren sind, sondern auch mit den 10<sup>14</sup> Bakterien des Dün- und Dickdarmes, gegen die er eine Toleranz bewahren soll [2, 3, 4, 5]. Für diese diffizilen Aufgaben verfügt die Mukosa des Gastrointestinaltraktes über effektive Mechanismen, die den Wirt vor dem Eindringen dieser potentiellen Noxen schützen. Die wichtigsten Bestandteile dieser Barriere umfassen einen protektiven Schleimfilm aus muziniösen Glykoproteinen, Phospholipiden und Lipidmediatoren, eine Epithelzellschicht und die darunter liegende Lamina propria [6]. Der Erhaltung und der Wiederherstellung der intestinalen Barriere nach Gewebeschädigung, wie z.B. bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, kommt eine zentrale Rolle in der Pathogenese vieler gastrointestinaler und systemischer Erkrankungen zu [7, 8].

Das Ziel der vorliegenden Arbeiten war es:

- Reparaturmechanismen der mukosalen Epithelschicht nach Verletzungen zu untersuchen und
- die Regulation der intestinalen Immunhomöostase unter besonderer Berücksichtigung von Zellzyklus und Apoptose mukosaler T-Zellen zu charakterisieren.

### **1.2 Aufbau und Funktion der intestinalen Barriere**

#### **1.2.1 Die mukosale Epithelzellschicht**

Das Mukosaepithel ist eine hochselektive Barriere, die die Passage potentiell toxischer Stoffen, wie z.B. von der intestinalen Mikroflora produzierte Endotoxine, in den Wirt verhindert, aber die Aufnahme von Nährstoffen aus dem intestinalen Lumen in die Zirkulation erlaubt. Das Mukosaepithel ist durch einen hohen Zellumsatz mit nahezu kompletten Austausch der intestinalen Epithelzellpopulation innerhalb von 24 bis 96 Stunden gekennzeichnet [9]. Das proliferative Epithelzellkompartiment ist innerhalb der intestinalen Krypten lokalisiert und räumlich von einem funktionellen Epithelzellkompartiment getrennt,

das zum Teil aus hochdifferenzierten Epithelzellen im Bereich der intestinalen Villi besteht. Epithelzellen des funktionellen Epithelzellkompartiments migrieren in Richtung Villusspitze und durchlaufen dabei eine zunehmende Differenzierung und Spezialisierung.

Unter physiologischen Bedingungen entsteht ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen der Neubildung von intestinalen Epithelzellen durch Proliferation und dem Verlust von Zellen durch natürlichen Zelltod, Apoptose sowie mechanische Abschilferung. Das intestinale Epithel ist durch eine hohe Regenerationsfähigkeit gekennzeichnet, die eine rasche Wiederherstellung der Integrität des Oberflächenepithels auch nach ausgedehnten Verletzungen ermöglicht. Die gastrointestinale epitheliale Wundheilung kann dabei vereinfacht in drei Phasen eingeteilt werden [9]:

- zuerst kommt es zu einer raschen Migration von Epithelzellen, die sich an den Wundrändern und dem Wundgrund befinden, in den Wunddefekt, wodurch eine rasche Versiegelung der Wunde bewirkt wird. Dieser Prozess, auch als epitheliale Restitution bezeichnet, verläuft unabhängig von der epithelialen Zellproliferation.
- Parallel dazu, bzw. im Anschluss an die Restitution, tritt eine Steigerung der epithelialen Zellproliferation ein, um zugrunde gegangene Zellen zu ersetzen.
- Anschließend erfolgt eine Differenzierung und Reifung der zunächst unreifen, durch gesteigerte Zellproliferation nachgewachsenen Zellen, damit die differenzierten Funktionen des ausgereiften intestinalen Oberflächenepithels wieder aufgenommen werden kann [10].

### 1.2.2 Das intestinale Immunsystem

Unterhalb der mukosalen Epithelzellbarriere existiert eine komplexe immunologische Barriere, die sich aus dem angeborenen, antigen-unspezifischen Abwehrsystem (innate immunity) und dem erworbenen, antigen-spezifischen Immunsystem (adaptive immunity) zusammensetzt. Das Immunsystem kann mit hoher Selektivität zwischen Pathogenen und der apathogenen, residenten Standortflora unterscheiden, wobei pathogene Keime nach spezifischen Antikörperreaktionen rasch eliminiert werden und eine systemische Immunreaktion auf Nahrungsmittelantigene und Antigene der physiologischen Darmflora unterdrückt wird [11].

Das antigen-unspezifische Abwehrsystem kann vereinfacht in vier Systeme unterteilt werden: die physiologische Barriere (Temperaturunterschiede, variierende pH -Werte und chemische Mediatoren wie Lysozyme, Komplementfaktoren oder Defensine), die anatomische Barriere (Haut, Mukosa), die phagozytotische und endozytotische Barriere (Phagozytose und Internalisierung von Antigenen) und die entzündliche Barriere (z.B. Chemotaxis, Freisetzung von Akutphase-Proteinen, Vasodilatation) [12]. Im Gegensatz zur unspezifischen Abwehr ist die erworbene Abwehr antigen-spezifisch, verfügt über ein immunologisches Gedächtnis und kann zwischen Fremd und Selbst-Antigenen unterscheiden. Die zellulären Bestandteile des antigen-spezifischen Immunsystems sind antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen oder Makrophagen, B- und T-Lymphozyten [11], [13].

Der wesentlichste Ort der intestinalen Immunantwort ist die Lamina propria, in die gereifte B- und T-Zellen nach Induktion durch ein Antigen in den Peyer'schen Plaques wandern [14]. Die Lamina propria besteht aus einer großen heterogenen Anzahl von lymphoiden und myeloiden Zellen, neben Lymphozyten lassen sich hier Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten und Mastzellen finden. Bei einer intestinalen Immunreaktion wird das Antigen durch antigenpräsentierende Zellen aufgenommen und das opsonierte Peptid den T-Zellen präsentiert. Durch die antigen-vermittelte Stimulierung der T-Zelle kommt es zu einer Aktivierung, Expansion und Differenzierung spezifischer T-Zellpopulationen. Diese können in Gedächtnis- und Effektorzellen unterteilt werden, führen zu einer Elimination des Antigens und besitzen somit eine zentrale Rolle in der mukosalen Immunabwehr des Wirtes. Aus der Vielzahl von Faktoren, die die intestinale Immunantwort modulieren können, spielen daher die T-Zellen der Lamina propria (LPT) eine wesentliche Rolle in der Modulation der intestinalen Entzündungsreaktion.

### **1.3 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von Lamina propria T-Zellen**

Lamina propria T-Zellen (LPT) bilden das größte immunologische Organ des Menschen [15]. Um ihrer spezialisierten Rolle in der mukosalen Immunabwehr gerecht zu werden, unterscheiden sich LPT bezüglich ihres Phänotypes und Funktion wesentlich von peripheren, zirkulierenden T-Zellen (PBT) [16, 17, 18]. Viele der distinkten Eigenschaften von LPT sind wahrscheinlich Folge ihrer

vorherigen Aktivierung durch Antigene und Mitogene, welche ihnen im GI-Trakt präsentiert wurden. Über 95% der LPT und intraepithelialen Lymphozyten sind Gedächtniszellen und exprimieren den CD45RO Rezeptor [18]. Sie sind adaptiert an ihre neuen Aufgabe durch die Exposition verschiedener Oberflächenantigene, die in der nativen T-Zelle nicht oder zu einem geringeren Niveau exprimiert werden. Das Migrieren der aktivierten T-Zelle in die Lamina propria wird ermöglicht durch die Aktivierung von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. Selektine oder Integrine [19, 20, 21, 22]. Im Vergleich zu PBT exprimieren LPT mehr Moleküle, die in der Zelladhäsion und Zellinteraktion involviert sind, wie z.B. CD2, LFA1, LFA3, CD29 oder CD44 [23].

Die Aktivierung von T-Zellen führt zu einer raschen Expression des IL-2-Rezeptors auf der Zelloberfläche und die autokrine und parakrine Interaktion von IL-2 mit seinem Rezeptor führt zur Proliferation und Differenzierung der T-Zellen [24, 25]. LPT sind in unmittelbarer physikalischen Nachbarschaft mit einer großen Anzahl von Antigenen und Mitogenen und befinden sich daher in einem ständigen Status der Zellaktivierung [18]. Im scheinbaren Gegensatz zu dem erhöhten Aktivierungsstatus von LPT ist die Proliferation dieser Zellen nach Antigenstimulation jedoch signifikant geringer als die von PBT [26, 27]. Kausal hierfür ist, dass LPT, verglichen mit PBT, nach Triggerung ihres TCR/CD3-Komplexes signifikant geringer in den Zellzyklus eintreten und expandieren [16]. Im Gegensatz hierzu proliferieren LPT nach Aktivierung des ko-stimulatorischen CD2-Rezeptors signifikant stärker als PBT [28], was LPT vor einer unkontrollierten Aktivierung durch die Vielzahl der luminalen Antigene des GI-Traktes schützt und Grundlage der sogenannten intestinalen Toleranz ist.

#### **1.4 Orale Toleranz**

Die physiologische Antwort des Immunsystems gegenüber Nahrungsmittelantigenen und der kommensalen Darmflora ist das Fehlen einer spezifischen Immunantwort, welches als orale Toleranz bezeichnet wird [29, 30]. Im Gegensatz hierzu kommt es bei der Präsentation von Pathogenen oder im Stadium der intestinalen Entzündung zu einer potenten mukosalen Immunantwort, die impliziert, dass das mukosale Immunsystem zwischen potentiell gefährlichen und harmlosen Antigenen unterscheiden kann. Die orale Toleranz ist bei intestinalen Immunerkrankungen, wie z.B. chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder der einheimischen Sprue gestört, wo es als Folge des

Verlustes der oralen Toleranz zu einer überschiessenden Immunantwort gegen Bestandteile der kommensalen Darmflora oder Gluten kommt [31, 32, 33].

Die physiologische Toleranz des intestinalen Immunsystems gegenüber den Antigenen der Nahrung und Darmflora wird durch vielfältige Mechanismen reguliert; die wichtigsten sind die klonale Deletion von antigenspezifischen T-Zellen, die Anergie durch das Fehlen ko-stimulatorischer Moleküle und die Präsenz von regulatorischen T-Zellen, wie z.B. Tr1- oder CD4+CD25+ Zellen [2], [4], [5], [14].

### **1.5 Störungen der intestinalen Barriere am Beispiel von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Die intestinale Barriere wird durch verschiedene Faktoren, wie z.B. Nahrungsbestandteile, die residente und pathogene Flora, regulatorische Peptide und verschiedene Nichtpeptidfaktoren, wie z.B. Phospholipide, Spurenelemente oder Adeninnukleotide moduliert. Aus der Vielzahl der modulierenden Faktoren spielen insbesondere regulatorische Peptide und Phospholipide eine essentielle Rolle, so dass diese im folgenden eingehender diskutiert werden sollen. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind charakterisiert durch rezidivierende Ulzerationen des Mukosaepithels, die zu einer Störung der intestinalen Barriere und konsekutiven Aktivierung des Mukosa-assoziierten Immunsystems führen. Diese Barrierestörung führt zu einer permanenten Aktivierung des mukosalen Immunsystems durch die luminale Darmflora und Nahrungsbestandteile, woraus eine persistierende chronische Entzündung resultiert. Daher erscheint es essentiell, neben einer Modulation der intestinalen Entzündung auch direkt die Wiederherstellung der intestinalen Integrität zu beeinflussen.

Untersuchungen anderer und unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass verschiedene Zytokine durch einen TGF- $\beta$  abhängigen Mechanismus die intestinale epitheliale Restitution stimulieren [34],[35],[36]. Neben der potenten Beeinflussung der epithelialen Restitution konnte auch gezeigt werden, dass eine Vielzahl von regulatorischen Peptiden die epitheliale Proliferation und Differenzierung beeinflusst, von denen TGF- $\beta$  eine herausgehobene Bedeutung hat, da es die Effekte verschiedener pro-proliferativer Peptide komplett inhibieren kann [34],[35],[36]. Da TGF- $\beta$  von nahezu allen Zellen exprimiert wird, nahezu alle Zellen Rezeptoren für TGF- $\beta$  tragen und es neben Epithelzellen auch die Funktion von Immunzell-Populationen und Fibroblasten beeinflusst [37, 38, 39], ist eine

selektive Beeinflussung des intestinalen Epithels durch TGF- $\beta$  kaum möglich. Eine systemische Beeinflussung der intestinalen Mukosa durch regulatorische Peptide wird auch dadurch erschwert, dass bei oraler Gabe diese Peptide durch Proteasen und die Darmflora degradiert und inaktiviert werden und somit eine direkte therapeutische Applikation kaum möglich erscheint. Im Gegensatz hierzu werden Nicht-Peptide, wie z.B. Phospholipide, Spurenelemente und Adeninnuklotide nicht vorzeitig gespalten. Neben ihrer ortständigen Funktion als Hauptbestandteil der Zellmembran verfügen einige Phospholipide und deren Metaboliten auch über die Fähigkeit, zelluläre Regulationsmechanismen zu modulieren, die einer Wachstumsfaktor-ähnlichen Beeinflussung verschiedener Zellfunktionen entspricht [40, 41].

Aus der Gruppe der zellmodulatorisch aktiven Phospholipide scheint die Lysophosphatidsäure (LPA) die stärkste Potenz hinsichtlich einer Wachstumsmodulation zu besitzen [42, 43]. LPA vermittelt ihre mitogenen Eigenschaften hauptsächlich über einen an der Zelloberfläche gelegenen, ca. 38-40 kDa schweren LPA-Rezeptor, der zu der Familie der G-Proteinrezeptoren gehört [44]. Neben einer Stimulation der Proliferation von Fibroblasten, kleinen Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und Keratinozyten fördert LPA die Thrombozytenaggregation und die Bindung des extrazellulären Matrixfaktors Fibronectin an die Zellmembran [42]. Diese Wachstumsfaktor-ähnliche Eigenschaften könnte eine Anwendung dieser Substanz zur Beeinflussung der intestinalen Mukosa nahe legen.

Bei einer Schädigung der intestinalen Schleimhautbarriere kommt es auch zu einer Kettenreaktion der membrangebundenen Phospholipide mit einer Oxidation von Lipiden und Freisetzung von Phospholipasen. Die Aktivierung dieser Enzyme gehört zu den ersten Schritten der Entzündungskaskade und führt direkt nach dem Antigenkontakt zu einer Hochregulierung der Phosphatidsäure-Synthese [45, 46]. Phosphatidsäure gehört zu den potentesten pro-inflammatorischen Botenstoffen und führt über die Lipoxygenase zu einer Freisetzung von Leukotrienen [47]. Schon seit einiger Zeit gibt es verschiedene therapeutische Ansätze, gezielt die Entstehung pro-inflammatorischer Phospholipidderivate zu blockieren. Die größten Erfahrungen beim Menschen liegen für Prostaglandin-E<sub>1</sub> bei Patienten mit ARDS, Leukotrien-Inhibitoren bei Patienten mit Asthma bronchiale oder „Platelet-

activating Factor“-Rezeptorantagonisten bei atopischen Erkrankungen, schweren Verbrennungen oder Colitis ulcerosa vor [48, 49].

Lisofylline ist ein funktioneller Inhibitor der Phosphatidsäure-Synthese und der TNF- $\beta$  Funktion [43, 46, 50]. Verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass bei einer Sepsis und einem akuten respiratorischen Versagen durch eine Blockierung der Bildung von Phosphatidsäure durch Pentoxifyllin oder Lisofylline eine gesteigerte Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  oder IL-1 $\beta$  verhindert werden kann, die Adhärenz neutrophiler Granulozyten vermindert wird und sich das Gesamtüberleben der Tiere verlängert [51, 52, 53]. Während eine Hemmung der Phosphatidsäure-Synthese durch Pentoxifyllin bei Patienten mit Morbus Crohn jedoch keinen therapeutischen Nutzen gezeigt hat [54], beeinflusst Lisofylline die experimentell induzierte Kolitis der Ratte günstig [55].

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kommt es zu einer umfassenden Veränderung des intestinalen Immunsystems [56]. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen befinden sich Lamina propria T-Zellen (LPT) im Vergleich zu LPT von nicht-entzündeten Kontrollgruppen in einem erhöhten Stadium der Aktivierung und exprimieren mehr CD71 (Transferrin-Rezeptor), IL-2 oder CD25 (IL-2 Rezeptor- $\alpha$ -Kette) [57]. Beim Morbus Crohn kommt es zu einer polyklonalen T-Zell-Aktivierung und einer verstärkten Resistenz der Zellen gegenüber dem programmierten Zelltod, der Apoptose [58, 59, 60, 61]. Diese vermehrte Proliferation der Zellen und verminderte Apoptose führt zu einer pathologischen Akkumulation von Entzündungszellen in der Lamina propria, welche zur Perpetuierung des Morbus Crohn beiträgt. Ein Ergebnis unserer Untersuchung zeigte, dass auch eine vermehrte Expression von Zellzykluspromotoren, eine gesteigerte Telomerasenaktivität und verminderte Expression des Fas-moleküls auf der Oberfläche von LPT bei Patienten mit Morbus Crohn zu dieser pathologischen Akkumulation beiträgt [62]. Weitere signifikante Unterschiede sind eine vermehrte p53 Produktion von Morbus Crohn-LPT sowie eine fehlende Telomerasenaktivität dieser Zellen, wodurch die fehlende Möglichkeit einer substanziellen Expansion der T-Zellpopulation bei Colitis ulcerosa erklärbar erscheint [62].

## 2 EIGENE ARBEITEN

Die intestinale Barriere bietet für den menschlichen Organismus einen effektiven Schutz vor den luminal präsentierten Fremdstoffen der Nahrung und Darmflora. Die Wiederherstellung dieser Barriere nach einer Verletzung und eine effektive Regulation der intestinalen Immunität und oralen Toleranz sind essentiell, um die mukosale Homöostase zu bewahren. Das Ziel der vorliegenden Arbeiten war es, Regulations- und Reparaturmechanismen der intestinalen Barriere und Immunabwehr zu untersuchen unter besonderer Berücksichtigung von:

- Untersuchungen zur Modulation der intestinalen Wundheilung durch Phospholipide
- Untersuchungen zur Charakterisierung des Einflusses peripherer mononukleärer Blutzellen auf die intestinale epitheliale Wundheilung
- Untersuchung zur Expression und Funktion von Interleukin-8 im Rahmen der intestinalen Wundheilung
- Untersuchungen zur Regulation des Zellzyklus von Lamina propria T-Zellen
- Untersuchungen zur Rolle von Caspasen in der Regulation von Apoptose und Zellzyklus von Lamina propria T-Zellen
- Untersuchungen zur Rolle der Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$  und HGF bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

### 2.1 Modulation der intestinalen Wundheilung durch Phospholipide

Neben ihrer ortständigen Funktion als Hauptbestandteil der Zellmembran verfügen einige Phospholipide und deren Metaboliten auch über die Fähigkeit, zelluläre Regulationsmechanismen zu modulieren, die einer Wachstumsfaktor-ähnlichen Modulation verschiedener intestinaler Zellfunktionen entspricht [41]. Aus der Gruppe der zellmodulatorisch aktiven Phospholipide scheint Lysophosphatidsäure (LPA) die stärkste Potenz hinsichtlich einer Wachstumsmodulation zu besitzen [42, 43, 63]. Aufgrund der oben dargestellten Wachstumsfaktor-ähnlichen Eigenschaften, der hohen Stabilität und guten Verfügbarkeit von LPA interessierte uns, ob LPA auch intestinale epitheliale Zellfunktionen modulieren könnte. Wir konnten erstmalig zeigen, dass LPA eine signifikante dosisabhängige Stimulation der intestinalen epithelialen Zellmigration (Restitution) sowie eine signifikante dosisabhängige Hemmung der intestinalen epithelialen Zellproliferation in-vitro bewirkt [64]. Die Modulation der epithelialen Proliferation und -migration erfolgt

durch einen TGF- $\beta$ -unabhängigen Mechanismus und wird über einen G-Protein-abhängigen Rezeptor vermittelt, wie wir im Rahmen umfangreicher Untersuchungen zur Signaltransduktion unter Verwendung spezifischer Modulatoren der Signaltransduktion wie Bradykinin, Phorbol ester, Pertussistoxin, Suramin und neutralisierender TGF- $\beta$  Antikörper belegen konnten [65].

Da unsere in-vitro Ergebnisse auch positive Effekte von LPA im Rahmen intestinaler epithelialer Wundheilungsmechanismen in-vivo vermuten ließen und da - wie oben dargestellt - LPA relativ stabil und in größeren Mengen verfügbar ist, untersuchten wir, ob die Effekte von LPA auch bei Entzündungs- und Wundheilungsvorgängen in-vivo nachvollzogen werden konnten. Dies erfolgte mit Hilfe des gut etablierten und weit verbreiteten experimentellen Kolitismodells der TNBS-Kolitis [66]. Dabei konnten wir zeigen, dass mit LPA behandelte Tiere einen verminderten Gewichtsverlust sowie ein geringeres Ausmaß an intestinaler Entzündung und Nekrose aufwiesen [65]. Auch eine histologische Evaluierung mit einer quantitativen Auswertung unter Verwendung eines standardisierten histologischen Scores zeigte, dass LPA eine raschere Wundheilung sowie eine geringere intestinale Entzündung in der experimenteller TNBS-Kolitis bewirkt [65].

Während einer Entzündungsreaktion kommt es durch die Aktivierung der Phospholipid-Biosynthese zu einer Generierung der pro-inflammatorischen Phosphatidsäure [46]. Lisofylline ist ein funktioneller Inhibitor dieser Phosphatidsäure und hemmt die Wirkung von TGF- $\beta$ . Wir untersuchten daher, ob es durch eine Hemmung der Phosphatidsäure-Synthese zu einer Beeinflussung einer intestinalen Entzündungsreaktion kommt. Nach Induktion einer Kolitis mit TNBS applizierten wir Lisofylline intraperitoneal bei Ratten welches den intestinalen Entzündungsscore bei den Tieren verbesserte, die Gewichtsabnahme reduzierte und die Akkumulation pro-inflammatorischer Botenstoffe in die intestinale Mukosa inhibierte [55].

Diese Untersuchungen zeigen erstmalig, dass eine Gabe von Phospholipiden mit wachstumsfaktor-ähnlichen Eigenschaften oder eine Modulation der Phosphatidsäure-Synthese intestinale Wundheilungsvorgänge beeinflussen kann und zeigen so die Möglichkeit auf, mukosale Entzündungsvorgänge bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durch diese Substanzen positiv zu beeinflussen.

## **2.2 Untersuchungen zum Einfluss peripherer mononukleärer Blutzellen auf die intestinale epitheliale Wundheilung**

Neben verschiedenen regulatorischen Peptiden und Nichtpeptiden können intestinale Epithelzellen auch durch direkte Zell-Zell-Interaktionen moduliert werden. Da die intestinale Mukosa eine wesentliche immunologische Funktion besitzt und das intestinale Epithel in enger räumlicher Beziehung mit verschiedenen Bestandteilen des Mukosa-assoziierten Immunsystems steht, sollten die Interaktionen des intestinalen Epithels mit klassischen Immunzellpopulationen weitergehend charakterisiert werden. Da auch periphere mononukleäre Blutzellen (PBMNC) im Rahmen von Homingvorgängen Kontakt mit intestinalen Epithelzellen erlangen können, wurden die Interaktionen von PBMNC, die von gesunden Kontrollpersonen gewonnen wurden, in einem Kokultursystem mit der nicht-transformierten intestinalen Epithelzelllinie IEC-6 in-vitro untersucht. Eine Kokultivierung von PBMNC und intestinalen Epithelzellen bewirkte eine signifikante Zunahme der epithelialen Restitution in-vitro [67]. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass PBMNC über einen IL-2- und IFN- $\gamma$ -abhängigen Mechanismus die intestinale epitheliale Restitution modulieren, während TGF- $\beta$  und TNF- $\alpha$  für die durch PBMNC vermittelte Stimulation der Restitution keine wesentliche Rolle spielen [67].

## **2.3 Untersuchung zur Sekretion und Funktion von Interleukin 8 auf die intestinale Wundheilung**

Interleukin-8 (IL-8) ist ein multifunktionelles Mitglied der  $\alpha$ -Chemokinfamilie der chemotaktischen CXC Zytokine. Es aktiviert neutrophile Granulozyten und bewirkt chemotaktisch ihre Rekrutierung in die intestinale Mukosa [68]. IL-8 spielt eine zentrale Rolle in der intestinalen Entzündungskaskade und seine Expression wird bei einer Vielzahl von akuten und chronischen Erkrankungen hochreguliert. Wir wollten daher untersuchen, welche Rolle IL-8 bei der intestinalen Wundheilung spielt. Dazu wurde zunächst die mRNA und Proteinexpression der beiden IL-8 Rezeptoren in intestinalen Epithelzellen untersucht. Wir konnten zeigen, dass in den intestinalen Epithelzelllinien HT-29 und Caco-2 nur der IL-8 Rezeptor CXCR-1, nicht aber CXCR-2 exprimiert wird (CXCL8 (Interleukin-8) modulates human intestinal epithelial cells through a CXCR1 dependent pathway. Cytokine; im Druck). Funktionelle Untersuchungen belegten, dass IL-8 die Migration intestinaler Epithelzellen in ein Wundgebiet fördert, die Proliferation dieser Zellen aber nicht

beeinflusst. Durch blockierende CXCR-1 und TGF- $\beta$  Antikörper konnten wir nachweisen, dass dieser Effekt autokrin über den IL-8 Rezeptor 1 CXCR-1 vermittelt wird und nicht TGF- $\beta$  abhängig ist (CXCL8 (Interleukin-8) modulates human intestinal epithelial cells through a CXCR1 dependent pathway. Cytokine; im Druck).

#### **2.4 Untersuchungen zur Regulation des Zellzyklus von Lamina propria T-Zellen**

In der intestinalen Mukosa müssen LPT gegenüber der Vielzahl luminaler Antigene eine immunologische Toleranz bewahren. Um diese Toleranz zu erreichen, haben sich LPT durch eine umfangreiche Adaptation ihres Phänotypes an ihre Rolle als gewebeständigen T-Zelle angepasst [16, 17, 18]. Da die Funktion von T-Zellen durch ihre Aktivierung mit der konsekutiven Proliferation und Expansion bestimmt wird, untersuchten wir die Zellzyklusregulation von LPT.

LPT sind im Gegensatz zu peripheren Blut T-Zellen (PBT) nach Stimulierung ihres Antigen-Rezeptors hypoproliferativ, expandieren jedoch nach Stimulation des CD2 Rezeptors mehr als PBT [16, 18]. Unsere Arbeiten zeigen, dass die Zeit, die LPT in den individuellen Zellzyklusphasen verbringt, signifikant länger als die von PBT ist. Hieraus folgte eine verlängerte S-Phasensynthesezeit, die konsekutiv zu einer geringeren Expansion der Zellen führt [16]. Weitere Unterschiede in der Zellzyklusregulation von PBT und LPT zeigten sich, als wir die Expression und Phosphorylierung von Zellzykluspromotoren und -inhibitoren untersuchten. Im Gegensatz zu PBT exprimieren LPT nach Stimulation, unabhängig von ihrem Status als Gedächtniszelle, vermehrt das Retinoblastoma Protein, Cyclin D, A und B1, welches den verlangsamte Zellzyklus von LPT erklärt. Unsere Untersuchungen zeigten jedoch auch, dass LPT nach ihrer Stimulierung über einen mit PBT vergleichbaren Aktivierungsstatus haben [16], welches impliziert, dass LPT über Mechanismen verfügen, die trotz gleicher Aktivierung, ihre Zellzyklusprogression aktiv inhibieren. Als Ursache hierfür konnten wir eine signifikant vermehrte Expression des Zellzyklusinhibitors p53 in LPT identifizieren [16]. In weiteren Experimenten konnten wir durch eine Blockierung dieses Proteins durch anti-sense Strategien die Geschwindigkeit der Zellzyklusprogression von LPT an die von PBT angleichen und somit die funktionelle Relevanz einer p53 Überexpression in LPT zeigen [16]. Zusammenfassend konnten somit p53 als

negativen Regulator des LPT Zellzyklus identifizieren, der die immunologische Toleranz durch die Inhibierung einer exzessiven T-Zellreplikation vermindert.

## **2.5 Untersuchungen zur Rolle von Caspasen in der Regulation von Apoptose und Zellzyklus von Lamina propria T-Zellen**

Die Depletion von T-Zellen nach Eliminierung des Antigens wird durch die Aktivierung des programmierten Zelltodes initiiert und verhindert die Ausbildung von Autoimmunerkrankungen oder Neoplasien [69]. LPT haben gegenüber PBT eine gesteigerte Apoptoserate [17, 70], was wahrscheinlich zur Bewahrung der intestinalen Immunhomöostase beiträgt. Caspasen, eine grosse Familie von Cysteinproteasen, initiieren und exekutieren den Zelltod [71]. Neben ihrer proapoptotischen Funktion wurde kürzlich auch gezeigt, dass bestimmte Caspasen auch für die Proliferation von PBT essentiell sind [17, 72].

Wir konnten zeigen, dass es in PBT nach ihrer Stimulierung zu einem signifikanten Anstieg der Caspasen 2, 3, 6 und 8 Aktivität kommt, die jedoch nicht die Apoptose dieser Zellen initiiert [17]. Wir zeigten, dass LPT nach ihrer Stimulierung eine signifikant geringere Caspasenaktivität als PBT haben, die jedoch im Gegensatz zu PBT zu einer signifikant höheren Apoptoserate führt [17]. Wir konnten nachweisen, dass bei LPT die Aktivierung der Caspase 8 eine entscheidende Rolle in der Apoptosekaskade hat, da eine Blockierung dieser Initiatorcaspase LPT vor den Antigen-induzierten Zelltod schützt [17]. Wir konnten weiterhin nachweisen, dass in Naiven und Gedächtnis PBT die Aktivierung bestimmter Caspasen für die Zellproliferation erforderlich sind, im Gegensatz hierzu die Verbindung zwischen Zelltod und Zellexpansion in LPT jedoch aufgehoben ist [17].

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die hohe Apoptoserate von LPT mit einer distinkten Caspase 8 Aktivität verknüpft ist und im Gegensatz zu PBT Caspasenaktivität und Zellproliferation nicht verbunden sind, eine Tatsache, die unabhängig von dem Status von LPT als Gedächtnis T-Zelle ist.

## **2.6 Untersuchungen zur Rolle der Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ und HGF bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  besitzt eine Schlüsselrolle für die intestinale epitheliale Wundheilung und die Effekte verschiedener, in der intestinalen Mukosa exprimierter Zytokine wie z.B. TGF- $\beta$ , HGF, FGF, IL-1, IL-2 und IFN- $\gamma$  [35, 40]. Da

TGF- $\beta$  und HGF in größerem Ausmaß bei intestinalen Entzündungen freigesetzt werden, wollten wir untersuchen, ob eine Bestimmung der TGF- $\beta$  und HGF Serumkonzentrationen eine Möglichkeit bieten, die Krankheitsaktivität oder den Schweregrad der Entzündung bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vorherzusagen. Daher wurden bei 29 Patienten mit Colitis ulcerosa und 45 Patienten mit Morbus Crohn sowie 28 gesunden Kontrollpatienten mit Hilfe von ELISA-Assays TGF- $\beta_1$  und HGF Plasmaspiegel bestimmt. Die in Doppelbestimmungen bestimmten Peptidspiegel wurden mit Krankheitsaktivitätsindices für Morbus Crohn (CDAI) und Colitis ulcerosa (CAI) sowie verschiedenen Laborparametern korreliert [73]. Wir konnten in allen Kontrollen und allen Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen TGF- $\beta_1$  und HGF im Plasma nachweisen. Obwohl eine Tendenz hinsichtlich erhöhter HGF- und TGF- $\beta_1$ -Peptidspiegel bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sichtbar war, waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen nicht signifikant. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa waren HGF-Plasmaspiegel positiv mit der Leukozytenzahl und negativ mit dem Serumalbumin und Hämatokrit korreliert. Bei Morbus Crohn-Patienten bestand eine positive Korrelation zwischen TGF- $\beta$ -Plasmaspiegel und Thrombozytenzahl [73].

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass TGF- $\beta_1$  und HGF Plasmaspiegel bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sich nicht signifikant von gesunden Probanden unterscheiden. Auch eine Stratifizierung der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nach entzündlicher Aktivität und Schweregrad der Erkrankung erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Es kann daher gefolgert werden, dass HGF und TGF- $\beta$  ihre Effekte autokrin und parakrin und nicht endokrin ausüben.

### 3 RELEVANTE ORIGINALARBEITEN

**Sturm A**, Becker A, Goebell H, Dignass AU. Lysophosphatidic acid modulates Intestinal Epithelial Cell Function. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 859, 223-226

**Sturm A**, Sudermann T, Schulte KM, Goebell H, Dignass AU. A. Modulation of intestinal epithelial wound healing in-vitro and in-vivo by lysophosphatidic acid. *Gastroenterology* 1999; 117: 368-377

Cario E, Becker A, **Sturm A**, Goebell H, Dignass AU. Peripheral blood mononuclear cells promote intestinal epithelial restitution in vitro through an interleukin-2/interferon-gamma-dependent pathway. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 1132-1138

**Sturm A**, Schulte C, Schatton R, Becker A, Cario E, Goebell H, Dignass AU. Transforming growth factor-beta and hepatocyte growth factor plasma levels in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 445-450

**Sturm A**, Dignass AU. Modulation of gastrointestinal wound repair and inflammation by phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1582: 282-288

**Sturm A**, Mohr S, Fiocchi C. Critical Role of Caspases in the Differential Regulation of Apoptosis and Proliferation of Mucosal and Peripheral T-Cells. *Gastroenterology* 2002; 122: 1334-1345

**Sturm A**, Itoh J, Jacobberger J, Fiocchi C. p53 negatively regulates intestinal immunity by delaying mucosal T cell cycling. *J Clin Invest* 2002; 109: 1481-1492

**Sturm A**, Zeeh J, Sudermann T, Rath H, Gerken G, Dignass AU. Lisofylline and Lysophospholipids ameliorate experimental Colitis in Rats. *Digestion* 2002; 66: 23-29

S. Danese, C. de la Motte, **Sturm A**, J.D. Vogel, G.A. West, S.A. Strong, J.A. Katz, C.Fiocchi. Platelets Trigger a CD40-dependent Inflammatory Response in the Microvasculature of Inflammatory Bowel Disease Patients. *Gastroenterology* 2003; 124: 1249-1264

**Sturm A**, Baumgart D, Harder'de-Heureuse J, Hotz A, Wiedenmann B, Dignass AU. CXCL8 (Interleukin-8) modulates human intestinal epithelial cells through a CXCR1 dependent pathway. *Cytokine* (im Druck)

#### 4 DISKUSSION

Der Organismus des Wirtes wird ständig mit Antigenen und Mitogenen der Nahrung sowie bakteriellen Bestandteilen der residenten und pathogenen Darmflora konfrontiert. Er muss dabei eine überschüssige Wirtsantwort auf die ihm präsentierten Antigene vermeiden, muss aber auch einen effektiven Schutz gegenüber pathogenen Einflüssen aufbauen. Zur Erfüllung dieser Doppelaufgabe hat der Organismus eine intestinale Barriere aufgebaut, deren drei Hauptbestandteile ein protektiver Schleimfilm, die mukosale Epithelschicht und die immunkompetenten Zellen der Lamina propria sind [6].

Die erste Grenzzone zwischen den Bestandteilen des gastrointestinalen Lumens und dem Wirt liegt oberhalb der Epithelschicht und wird aus einem Film muzinöser Glykoproteine und biphasischer Lipide gebildet [74]. Während einer Entzündungsreaktion kommt es zu einer Aktivierung der Phospholipid-Biosynthese und Freisetzung von Lipidmediatoren, die die immunologische Reaktion des Organismus hinsichtlich Entzündungs- und Wundheilungsreaktionen modulieren [41, 75, 76, 77]. Aus der Gruppe der zellmodulatorisch aktiven Phospholipide scheint die LPA die stärkste Potenz hinsichtlich einer Wachstumsmodulation zu besitzen [78, 79]. Wir konnten erstmalig zeigen, dass LPA die Migration intestinaler Epithelzellen nach einer Verletzung fördert und dass dieser Effekt durch die Bindung von LPA an G-Proteinrezeptoren der Epithelzellen vermittelt wird [65]. Die Migration epithelialer Zellen in eine Wunde führt zu einer raschen Versiegelung des Wunddefektes, stellt somit die epitheliale Barrierefunktion gegenüber den Pathogenen des Darmlumens wieder her und ist daher einer der wichtigsten Schritte zur Wiederherstellung der intestinalen Barriere [9].

TGF- $\beta$  spielt eine zentrale Rolle in der epithelialen Zellmigration und Proliferation und zahlreiche Zytokine vermitteln ihre Effekte über TGF- $\beta$  abhängige Signalwege [35, 40]. In Keratinozyten fördert LPA die Proliferation über einen TGF- $\beta$  abhängigen Signalweg [79]. Wir konnten jedoch zeigen, dass im Gegensatz hierzu die Restitution von intestinalen Epithelzellen durch LPA über einen TGF- $\beta$  unabhängigen, G-Protein-vermittelten Signalweg beeinflusst wird [65]. Auch in Fibroblasten, Endothelzellen oder Keratinozyten bindet LPA an einen G-Protein-abhängigen Rezeptor, steigert aber die Proliferation in diesen Zellen [78, 79]. Im Gegensatz hierzu inhibiert LPA die Proliferation intestinaler Epithelzellen und zeigt

so, dass es trotz der gemeinsamen Bindung von LPA an den G-Proteinrezeptor der Zellen intrazellulär unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden [65].

Proliferation und Migration sind entscheidend für die Modulation der intestinalen Wundheilung, die nach dem Auftreten von Verletzungen, z.B. im Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Strahlenkolitis, infektiöser Kolitis oder der einheimischer Sprue, auftreten. Um den Einfluss von LPA auf die intestinale Wundheilung in-vivo zu untersuchen, behandelten wir Ratten, bei denen eine Kolitis chemisch durch TNBS induziert wurde, mit LPA [65]. Gegenüber der mit Placebo behandelten Gruppe kam es bei den mit LPA behandelten Tieren zu einer signifikanten Abnahme der intestinalen Entzündungsreaktion und Akkumulation pro-inflammatorischer Botenstoffe in der intestinalen Mukosa [65].

Die Synthese von Phosphatidsäure durch pro-inflammatorische Mediatoren wie z.B. IL-1, TNF- $\alpha$ , LPS oder PAF spielt eine zentrale Rolle in der Entzündungskaskade [80]. Lisofylline inhibiert die Lipidperoxidation und unterdrückt so die Synthese von pro-inflammatorischer Zytokine [81, 82]. Durch die Inhibierung distinkter Signaltransduktionswege blockiert Lisofylline auch die Effekte des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  [83], das eine zentrale Rolle in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen einnimmt. Durch die systemische Applikation von Lisofylline konnten wir in einem experimentellen Kolitismodel die intestinale Entzündungsreaktion nach TNBS Gabe signifikant reduzieren, den Gewichtsverlust verringern und das Überleben der Tiere fördern [55]. Diese Untersuchungen zeigen, dass sowohl durch eine topische Applikation von Phospholipiden, als auch durch die systemische Inhibierung der Phosphatidsäure-Synthese die intestinale Wundheilung nach einer Verletzung gefördert werden kann und somit die Möglichkeit bietet, LPA und Lisofylline therapeutisch, z.B. bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, einzusetzen. Hier müssen weitere Studien folgen, die diese Effekte in anderen Tiermodellen weiter verifizieren.

IL-2 wird hauptsächlich von T-Lymphozyten nach ihrer Aktivierung synthetisiert und ist ein essentieller Wachstumsfaktor für alle T-Zell-Subpopulationen [84]. IL-2 ist ein antigen-unspezifischer Proliferationsfaktor für T-Zellen, der sowohl autokrin, als auch parakrin die Progression ruhender Zellen in den Zellzyklus bewirkt und eine klonale Expansion der aktivierten T-Zellen bewirkt [85]. Während einer

intestinalen Entzündungsreaktion kommt es zu einer Aktivierung von T-Zellen der intestinalen Mukosa. Da bekannt ist, dass die intestinale Epithelzellschicht die Funktion der immunkompetenten Zellen der darunter liegenden Lamina propria beeinflusst [86, 87, 88, 89, 90, 91], wollten wir untersuchen, ob es auch umgekehrt zu einer Beeinflussung der Epithelzellfunktion durch Faktoren kommt, die während einer intestinalen Entzündungsreaktion durch T-Zellen sezerniert werden. Unsere Untersuchungen zeigten, dass eine Kokultivierung von Epithelzellen mit T-Zellen die Migration von intestinalen Epithelzellen über eine gesteigerte Produktion von IL-2 signifikant beschleunigt. Dies legt somit nahe, dass sich T-Zellen und Epithelzellen bilateral beeinflussen [67].

Die unterhalb der Epithelzellschicht liegende Lamina propria besteht aus einer großen Anzahl von B-Zellen, Plasmazellen, Makrophagen und T-Zellen. LPT repräsentieren eine hoch spezialisierte Population von Immunzellen, die im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe (gut-associated lymphoid tissue, GALT) generiert werden und nach Zirkulation durch die Blutstrombahn in die intestinale Mukosa migrieren ("homing")[37]. Die Erhaltung der intestinalen Immunhomöostase erfordert, dass Proliferation, Expansion, Zytokinproduktion und Apoptose von LPT streng geregelt werden müssen. Wir konnten zeigen, dass LPT nach Stimulation ihres TCR/CD3 Komplexes ihre maximale Proliferationsrate nach 4-6 Tagen erreichen, während PBT, unabhängig von ihrem Phänotyp als naive (CD45RA+) oder Gedächtnis T-Zellen (CD45RO+) das Maximum ihrer proliferativen Kapazität bereits nach 2-3 Tagen erreicht haben [16]. Interessanterweise ist jedoch das mitochondriale Membranpotential als Hinweis auf den zellulären Energiestatus der Zellen in aktivierten PBT und LPT vergleichbar, welches daher eine intrinsische Inhibierung der Zellzyklusprogression von LPT vermuten lässt [16]. p53 ist ein wichtiger Zellzyklusinhibitor und induziert die Apoptose von Zellen, wenn DNA Schäden auftreten [92, 93]. Wir konnten erstmalig zeigen, dass LPT eine im Vergleich mit PBT signifikante höhere Expression von p53 haben und konnten durch Blockierung der p53 Expression in LPT die Geschwindigkeit des LPT Zellzyklus an den von PBT anpassen [16]. LPT von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen haben, verglichen mit LPT von Patienten ohne intestinale Entzündung, eine signifikant geringere Expression von p53 [62], wodurch die wichtige Rolle von p53 als Regulator der intestinalen Immunantwort unterstrichen

und eine wichtige Rolle dieses Zellzyklusinhibitors in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen impliziert wird.

Um nach einer Stimulation und Eliminierung des Antigens die Immunantwort zu terminieren und eine überschüssige Immunantwort zu verhindern, aktivieren T-Zellen den programmierten Zelltod, die Apoptose [69]. Verglichen mit PBT haben LPT eine höhere Apoptoserate nach Antigenstimulation (antigen-induced cell death, AICD) [94]. Caspasen sind Initiatoren, aber auch Exekutoren der Apoptose [71]. Wir konnten zeigen, dass die Apoptose von LPT über Caspase-8 vermittelt wird und die Inhibierung dieser Caspase den AICD von LPT verhindert [17]. Caspase-8 spielt eine zentrale Rolle in der Fas-vermittelten Apoptose [95] und die Aktivierung dieses Enzyms, zusammen mit der vermehrten Expression von Fas auf LPT [94, 96], demonstriert somit, dass die Apoptose von LPT über den Typ I Signalweg der extrinsischen Apoptose vermittelt wird [17]. Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind durch einen mukosalen Gewebeschaden charakterisiert, der durch eine pathologische T-Zellfunktion bedingt ist [97]. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass LPT bei Morbus Crohn die Toleranz gegenüber der eigenen Darmflora verloren haben [31, 33, 98] und eine verminderte Apoptoserate haben [59, 60, 61], die gemeinsam zu einer Akkumulation von T-Zellen in der Mukosa führen. Im Gegensatz hierzu exprimieren LPT von Patienten mit Colitis ulcerosa, verglichen mit Kontrollgruppen und Morbus Crohn-LPT, vermehrt Fas [99], welches auf eine gesteigerte Apoptoserate hinweist. Wir konnten zeigen, dass LPT von Patienten mit Morbus Crohn ihre DNA, verglichen mit LPT von Patienten mit Colitis ulcerosa und Kontrollgruppen, signifikant schneller replizieren, woraus eine gesteigerte Zellzyklusprogression und Expansion der Zellen resultiert [62]. Die Produktion von Zytokinen, wie z.B. IFN- $\gamma$  oder IL-4, steigt proportional mit der Anzahl der durchschrittenen Zellzyklen [100, 101, 102]. Die gesteigerte Zellzyklusprogression von Morbus Crohn-LPT könnte somit erklären, warum die IFN- $\gamma$  Produktion bei Morbus Crohn, nicht jedoch bei Colitis ulcerosa erhöht ist [103].

Die Lebensdauer und Möglichkeit zur Expansion einer Zelle wird von vielen Faktoren beeinflusst, von denen die Telomerase, eine RNA-abhängige DNA Polymerase, eine zentrale Rolle einnimmt [104, 105, 106]. Telomerasen verlängern Telomere an den Enden der Chromosomen bei einer Zellteilung und erhalten so die Fähigkeit zur Zellteilung [107]. Verglichen mit LPT von Patienten

ohne intestinale Entzündung ist die Telomerasenaktivität bei Patienten mit Morbus Crohn signifikant höher, wodurch eine verstärkte LPT Proliferation und Expansion bei Morbus Crohn erklärbar ist [62]. Im Gegensatz hierzu konnte in LPT von Patienten mit Colitis ulcerosa keine Telomerasenaktivität nachgewiesen werden. Dies könnte ihre fehlende Möglichkeit zur Expansion erklären [62]. Diese Unterschiede sind überraschend, da das externe Milieu einschließlich der kontinuierlichen Stimulation der Zellen durch Antigene bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa vergleichbar ist. Auch in PBT von Patienten mit einer HIV-Infektion ist die Telomerasenaktivität signifikant verringert und deutet auf einen erhöhten Anteil aneurer T-Zellen hin [108]. Warum Colitis ulcerosa-LPT möglicherweise anerg sind, ist noch unklar. Es wird ein systemischer Defekt postuliert, eine Hypothese, die durch die nachgewiesene genomische Instabilität und hohen Frequenz von Telomeren in PBT von Patienten mit Colitis ulcerosa gestützt wird [109].

Die intestinale Entzündung wird als ein Prozess betrachtet, bei dem Effektorzellen des Immunsystems andere Zellen der intestinalen Mukosa zerstören. Während lange Zeit angenommen wurde, dass Nicht-Immunzellen der intestinalen Mukosa, wie z.B. Thrombozyten, nur passiv an dieser Entzündungsreaktion teilnehmen, hat sich durch neuere Arbeiten gezeigt, dass es bei einer intestinalen Entzündung zu einer komplexen Interaktion zwischen Immun und Nicht-Immunzellen kommt [110]. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass aktivierte Thrombozyten den CD40 Liganden (CD40L) exprimieren. Dies ermöglicht, dass diese Zellen mit der großen Anzahl an CD40 tragenden Immunzellen interagieren [111]. Wir konnten zeigen, dass Thrombozyten von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa spontan und nach Aktivierung durch Thrombin CD40L exprimieren und so belegen, dass Thrombozyten bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in einem dauerhaften Stadium der Aktivierung sind [112]. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kommt es häufig zu einer reaktiven Thrombozytose und fehlgesteuerten Thrombopoese [113, 114], die möglicherweise auch durch die beobachtete erhöhte Aktivierung von Thrombozyten bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erklärt werden kann.

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kommt es zu einer Aktivierung von Endothelzellen der intestinalen Mukosa und vermehrten Expression von

Zelladhäsionsmolekülen und Chemokinen [115, 116]. Die vermehrte Expression von Zelladhäsionsmolekülen in Endothelzellen (HIMEC) wird durch CD40 vermittelt [117]. Wir konnten zeigen, dass HIMEC durch CD40+ Thrombozyten aktiviert werden und die Expression der zentralen Zelladhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 stimulieren [112]. Die Expression von VCAM-1 und ICAM-1 konnte noch weiter gesteigert werden, wenn Thrombozyten von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen isoliert wurden und mit HIMEC ko-kultiviert wurden [112]. Die CD40L+ Thrombozyten binden an Endothelzellen und führen so unter anderem zu einer vermehrten Expression auch von IL-8 [112]. Wie wir in anderen Untersuchungen zeigen konnten, fördert dieses Chemokin die intestinale Restitution in-vitro (Sturm A, Baumgart D, Harder'de-Heureuse J, Hotz A, Wiedenmann B, Dignass A. CXCL8 (Interleukin-8) modulates human intestinal epithelial cells through a CXCR1 dependent pathway. Cytokine, im Druck). Diese Untersuchungen belegen somit, dass Thrombozyten aktiv an der multifaktoriellen mukosalen Entzündungskaskade teilnehmen und der Aktivierung von Thrombozyten eine pathophysiologische Rolle zukommt, die bisher klassischen Immunzellen vorbehalten war.

In den hier vorgelegten Arbeiten werden verschiedene Aspekte der intestinalen Barriere untersucht und Möglichkeiten zur Restitution der intestinalen Wundheilung nach Verletzung der Epithelzellschicht und Regulationsmechanismen von T-Zellen der Lamina propria untersucht. Hierbei konnte insbesondere gezeigt werden, dass der Regulation von Caspasen und dem Zellzyklusinhibitor p53 in der Bewahrung der mukosalen Immunhomöostase eine zentrale Rolle zukommt [16, 17]. Caspaseinhibitoren haben in verschiedenen Tiermodellellen, z.B. der bakteriellen Meningitis, des M. Parkinson oder der amyotrophen Lateralsklerose einen therapeutischen Einfluss gezeigt [118]. Da ihr Einsatz jedoch auch die Gefahr einer unkontrollierten Zellproliferation und kanzerogenen Wirkung beinhaltet, müssen weitere Untersuchungsergebnisse abgewartet werden. Dies gilt auch für p53, welches in nahezu allen Tumorerkrankungen mutiert oder vermindert exprimiert wird [119]. Auch bei Morbus Crohn ist die p53 Expression vermindert und eine p53 Gentherapie wäre eine grundsätzlich mögliche therapeutische Option in der Behandlung vom Morbus Crohn. Bisherige Therapiestudien mit p53 bei onkologischen Erkrankungen konnten jedoch die erfolgsversprechenden Daten der Tierversuche nicht immer bestätigen [120, 121, 122, 123, 124], so dass eine erfolgreiche

Umsetzung der durch in-vitro Untersuchungen erhobenen Erkenntnisse in-vivo nicht zwangsläufig gesichert ist. Vorsicht scheint in diesem Zusammenhang insbesondere aufgrund der multifaktoriellen Natur der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen angebracht.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die intestinale Mukosa bildet eine biologisch wichtige Barriere zwischen dem Organismus und den schädigenden Faktoren im intestinalen Lumen. Der menschliche Organismus ist über eine Grenzfläche von 200-400m<sup>2</sup> ständig seiner Umwelt exponiert. Die intestinale Mukosabarriere muss dabei einen wirksamen Schutz gegenüber den luminalen Noxen und Fremdstoffen bieten, jedoch tolerant gegenüber den 10<sup>14</sup> Bakterien des Darmes und den Antigenen der Nahrung sein. Diese komplexe Aufgabe wird durch eine hochdifferenzierte intestinale Mukosa bewältigt, die eine strukturelle sowie funktionelle intestinale Barriere bildet. Diese setzt sich aus einem muzinösen Schleimfilm, der darunter liegenden Epithelzellschicht und der Lamina propria zusammen.

Im Rahmen verschiedener Erkrankungen, z.B. chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, infektiöser Enteritis, Strahlenenteritis, Sprue sowie ischämischen Enteropathien werden Störungen der intestinalen Barrierefunktion mit einer konsekutiven Aktivierung des mukosalen Immunsystems beobachtet. Die Wiederherstellung der Integrität der intestinalen Mukosabarriere und Kontrolle der fehlgesteuerten mukosalen Entzündungsreaktion ist somit wesentlich für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Organismus. Experimentelle Untersuchungen in den letzten Jahren haben gezeigt, dass die intestinale Barriere durch eine Vielzahl von exogenen und endogenen Faktoren gesteuert wird. Diese Untersuchungen zeigen, dass die Bewahrung der Integrität und Wiederherstellung der intestinalen mukosalen Barriere komplexen multifaktoriellen Steuerungsmechanismen unterliegt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeiten war, ausgewählte Aspekte der Regulations- und Reparaturmechanismen der intestinalen mukosalen Barriere weitergehend zu charakterisieren. Schwerpunkte der Untersuchungen waren:

- Charakterisierung von Faktoren, die intestinale epitheliale Wundheilungsvorgänge beeinflussen unter besonderer Berücksichtigung von
  - regulatorischen Peptiden
  - Lipidmediatoren
  - Zell-Zell Interaktionen
- funktionelle Charakterisierung von Lamina propria T-Zellen unter besonderer Berücksichtigung von

- Zellzyklussteuerung
- Apoptosevorgängen

Die Untersuchungen wurden

- mit Hilfe unterschiedlicher in-vitro Systeme
- tierexperimenteller Untersuchungen in einem Kolitismodell der Ratte
- peripheren und mukosalen T-Zellen von gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durchgeführt.

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen wurden als humanes Erkrankungsmodell ausgewählt, da eine Schädigung der Mukosabarriere mit nachfolgender intestinaler Entzündung ein charakteristisches Merkmal von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind und somit als Mustererkrankungen für Untersuchungen von intestinalen Barrierestörungen und mukosaler Entzündung angesehen werden können.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass das natürlicherweise vorkommende Phospholipid Lysophosphatidsäure (LPA) eine signifikante dosisabhängige Stimulation der intestinalen epithelialen Zellmigration (Restitution) sowie eine signifikante dosisabhängige Hemmung der intestinalen epithelialen Zellproliferation in-vitro bewirkt. Die Modulation der epithelialen Proliferation und Migration erfolgt durch einen TGF- $\beta$ -unabhängigen Mechanismus und wird über einen G-Protein-abhängigen Rezeptor vermittelt, wie wir im Rahmen umfangreicher Untersuchungen zur Signaltransduktion unter Verwendung spezifischer Modulatoren der Signaltransduktion wie Bradykinin, Phorbol ester, Pertussistoxin, Suramin und neutralisierender TGF- $\beta$ -Antikörper belegen konnten.

Unter Verwendung des gut etablierten und weit verbreiteten experimentellen Kolitismodells der TNBS-Kolitis konnten wir belegen, dass LPA auch in-vivo einen wundheilungsfördernden Effekt besitzt. Die topische Applikation von LPA in diesem experimentellen Kolitismodell bewirkte einen geringeren Gewichtsverlust sowie ein geringeres Ausmaß an intestinaler Entzündung und Nekrose in-vivo. Die histologische Evaluierung und quantitative Auswertung unter Verwendung eines standardisierten histologischen Scores belegt, dass LPA eine raschere Wundheilung sowie eine geringere intestinale Entzündung in-vivo bewirkt. Diese Untersuchungen legen somit nahe, dass LPA die intestinale epitheliale Wundheilung durch eine Modulation der intestinalen epithelialen Migration und

Proliferation durch TGF- $\beta$ -unabhängige Mechanismen stimuliert. Die exogene Gabe von LPA könnte somit eine alternative Möglichkeit darstellen, epitheliale Wundheilungsvorgänge in-vivo zu modulieren.

Neben einem topischen Einfluss von Phospholipiden auf die intestinale Wundheilung, konnten wir auch zeigen, dass eine systemische Applikation von Lisofylline, einem funktionellen Inhibitor der Phosphatidsäure, die intestinale Entzündung in einem experimentellen TNBS-Kolitismodell signifikant verbessert. Diese Untersuchungen belegen somit nicht nur, dass Bestandteile des muzinösen Schleimfilmes mit der mukosalen Epithelzellschicht interagieren und nach einer Verletzung die epitheliale Restitution fördern, sondern bieten möglicherweise auch therapeutische Optionen in der Behandlung von intestinalen Entzündungen.

In weiteren in-vitro Untersuchungen konnten wir zeigen, dass neben der oben beschriebenen Modulation der intestinalen epithelialen Wundheilung durch Phospholipide auch eine Stimulation der intestinalen epithelialen Restitution in-vitro durch periphere mononukleäre Blutzellen bewirkt werden kann. Diese Zellen wurden aus Vollblut von gesunden Probanden isoliert und in eine Zweikammer in-vitro-Kokultur eingebracht, so dass die beiden Zellpopulationen keinen direkten Zellkontakt erlangen konnten. Eine Kokultivierung von peripheren mononukleären Blutzellen und intestinalen Epithelzellen bewirkte eine signifikante Zunahme der epithelialen Restitution in-vitro. Ergänzende Untersuchungen zeigten, dass PBMNC über einen IL-2- und IFN- $\gamma$ -abhängigen Mechanismus die intestinale epitheliale Restitution modulieren, während TGF- $\beta$  und TNF- $\alpha$  für die durch PBMNC vermittelte Stimulation der Restitution keine wesentliche Rolle besitzen.

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit der funktionellen Charakterisierung von Lamina propria T-Zellen (LPT) und peripheren Blut T-Zellen (PBT). Wir konnten zeigen, dass der Zellzyklus von LPT distinkt von PBT reguliert wird. Hierbei spielt der Zellzyklusinhibitor p53 eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation von LPT und die Blockierung seiner Proteinexpression beschleunigt die Expansionsgeschwindigkeit von LPT auf das Niveau von PBT.

Um Autoimmunität zu verhindern, muss es nach einer Eliminierung des Antigens wieder zu einer Depletion des Pools an Effektor-T-Zellen durch die Aktivierung der Apoptose kommen. Bei LPT von Morbus Crohn Patienten ist die Apoptoserate vermindert, wodurch es zu einer vermehrten Akkumulation von T-Zellen in der

Lamina propria kommt und eine Schädigung der intestinalen Mukosa durch eine unkontrollierte Entzündung resultiert. Wir konnten zeigen, dass beim Antigen-induzierten Zelltod von LPT der intrinsische Apoptoseweg aktiviert wird und Caspase-8 hierbei eine zentrale Rolle spielt. Physiologischerweise sind Zellzyklus und Apoptose eng miteinander verbunden. In weiteren Versuchen konnten wir jedoch zeigen, dass dies nicht bei LPT der Fall ist und somit die von PBT distinkte Regulation von Zellzyklus und Apoptose mukosaler T-Zellen weiter unterstreichen.

Zusammengefasst konnten wir durch ausgewählte Untersuchungen zeigen, dass die intestinale Barriere und ihre funktionelle Beeinflussung eine wesentliche Rolle in der Pathogenese und Therapie intestinaler Entzündungen besitzt. Eine Beeinflussung intestinaler Reparaturprozesse und Modulation abnormer T-Zellen könnte neue Möglichkeiten in der Therapie intestinaler Entzündungen, wie z.B. chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bewirken.

**LITERATURVERZEICHNIS**

- (1) Stallmach, A. und Zeitz, M. (1999): Immunologie des Intestinaltraktes, Caspary, W. F. und Stein, J., Darmkrankheiten , Seite 55-61, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.
- (2) Strobel, S. und Mowat, A. M. (1998): Immune Response to dietary antigens: oral tolerance, Immunol.Today (Band 19), Seite 173-181.
- (3) Bailey, M.; Plunkett, F. J.; Rothkotter, H. J.; Vega-Lopez, M. A.; Haverson, K. und Stokes, C. R. (2001): Regulation of mucosal immune responses in effector sites, Proc.Nutr.Soc. (Band 60), Nr. 4, Seite 427-435.
- (4) Kamradt, T und Mitchison, N. A. (2001): Tolerance and Autoimmunity, N.Engl.J.Med. (Band 344), Nr. 9, Seite 655-664.
- (5) Mackay, I. R. und Rosen, F. S (2001): Tolerance and Autoimmunity, N.Engl.J.Med. (Band 344), Seite 655-664.
- (6) Mowat, A. M. (2003): Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens, Nat.Rev.Immunol. (Band 3), Nr. 4, Seite 331-341.
- (7) Farhadi, A.; Banan, A.; Fields, J. und Keshavarzian, A. (2003): Intestinal barrier: an interface between health and disease, J.Gastroenterol.Hepatol. (Band 18), Nr. 5, Seite 479-497.
- (8) Nagler-Anderson, C. (2001): Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa, Nat.Rev.Immunol. (Band 1), Nr. 1, Seite 59-67.
- (9) Dignass, A. U. (2001): Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair, Inflamm.Bowel.Dis. (Band 7), Nr. 1, Seite 68-77.
- (10) Dignass, A.; Sturm, A. und Podolsky, D. J. (1999): Epithel injury and restitution, Domschke, W.; Stoll, R.; Brasitius, T. A. und Kagnoff, M. F., Intestinal Mucosa and its Diseases , Seite 2943-300, Kluwer Academic Publisher, London.
- (11) Mackay, I. R. und Rosen, F. S (2000): The Immune System - First of Two Parts, N.Engl.J.Med. (Band 341), Seite 37-49.
- (12) Goldsby, R. A.; Kindt, T. J. und Osborne, B. A. (2000): Overview of the Immune Systemw, Goldsby, R. A.; Kindt, T. J. und Osborne, B. A., Immunology , Seite 3-26, Freemann, New York.

- (13) Delves, P. J. und Roitt, I. M. (2000): The Immune System; Second of Two Parts, N.Engl.J.Med. (Band 343), Seite 108-117.
- (14) Wittig, B. M. und Zeitz, M. (2003): The gut as an organ of immunology, Int.J.Colorectal Dis. (Band 18), Nr. 3, Seite 181-187.
- (15) Reinhardt, R. L.; Khoruts, A.; Merica, R.; Zell, T. und Jenkins, M. K. (2001): Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body, Nature (Band 410), Seite 101-105.
- (16) Sturm, A.; Itoh, J.; Jacobberger, J. W. und Fiocchi, C. (2002): p53 negatively regulates intestinal immunity by delaying mucosal T cell cycling, J.Clin.Invest (Band 109), Seite 1481-1492.
- (17) Sturm, A.; Mohr, S. und Fiocchi, C. (2002): Critical role of caspases in the regulation of apoptosis and proliferation of mucosal T cells, Gastroenterology (Band 122), Seite 1334-1345.
- (18) Schieferdecker, H. L.; Ullrich, R.; Hirseland, H. und Zeitz, M. (1992): T cell differentiation antigens on lymphocytes in the human intestinal lamina propria, J.Immunol. (Band 149), Nr. 8, Seite 2816-2822.
- (19) Dailey, M. O. (1998): Expression of T lymphocyte adhesion molecules: regulation during antigen-induced T cell activation and differentiation, Crit Rev.Immunol. (Band 18), Nr. 3, Seite 153-184.
- (20) Dalton, S. L.; Scharf, E.; Briesewitz, R.; Marcantonio, E. E. und Assoian, R. K. (1995): Cell adhesion to extracellular matrix regulates the life cycle of integrins, Mol.Biol.Cell (Band 6), Nr. 12, Seite 1781-1791.
- (21) Ochieng, J.; Leite-Browning, M. L. und Warfield, P. (1998): Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3, Biochem.Biophys.Res.Comm. (Band 246), Nr. 3, Seite 788-791.
- (22) Schwartz, M. A. und Ingber, D. E. (1994): Integrating with integrins, Mol.Biol.Cell (Band 5), Nr. 4, Seite 389-393.
- (23) Krivacic, K. A. und Levine, A. D. (2003): Extracellular matrix conditions T cells for adhesion to tissue interstitium, J.Immunol. (Band 170), Nr. 10, Seite 5034-5044.

- (24) Fiocchi, C. (1989): Lymphokines and the intestinal immune response. Role in inflammatory bowel disease, *Immunol.Invest* (Band 18), Nr. 1-4, Seite 91-102.
- (25) Qiao, L.; Schurmann, G.; Betzler, M. und Meuer, S. C. (1991): Activation and signaling status of human lamina propria T lymphocytes, *Gastroenterology* (Band 101), Nr. 6, Seite 1529-1536.
- (26) Carol, M.; Lambrechts, A.; Van Gossum, A.; Libin, M.; Goldman, M. und Mascart-Lemone, F. (1998): Spontaneous secretion of interferon gamma and interleukin 4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes, *Gut* (Band 42), Nr. 5, Seite 643-649.
- (27) MacDonald, T. T. (1999): Effector and regulatory lymphoid cells and cytokines in mucosal sites, *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* (Band 236:113-35.), Seite 113-135.
- (28) Targan, S. R.; Deem, R. L.; Liu, M.; Wang, S. und Nel, A. (1995): Definition of a lamina propria T cell responsive state. Enhanced cytokine responsiveness of T cells stimulated through the CD2 pathway, *J.Immunol.* (Band 154), Nr. 2, Seite 664-675.
- (29) Mowat, A. M. und Viney, J. L. (1997): The anatomical basis of intestinal immunity, *Immunol.Rev.* (Band 156), Seite 145-166.
- (30) Garside, P. und Mowat, A. M. (2001): Oral tolerance, *Semin.Immunol.* (Band 13), Nr. 3, Seite 177-185.
- (31) Duchmann, R.; Kaiser, I.; Hermann, E.; Mayet, W.; Ewe, K. und Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1995): Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD), *Clin.Exp.Immunol.* (Band 102), Nr. 3, Seite 448-455.
- (32) Duchmann, R.; Neurath, M.; Marker-Hermann, E. und Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1997): Immune responses towards intestinal bacteria--current concepts and future perspectives, *Z.Gastroenterol.* (Band 35), Nr. 5, Seite 337-346.
- (33) Duchmann, R.; Neurath, M. F. und Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1997): Responses to self and non-self intestinal microflora in health and inflammatory bowel disease, *Res.Immunol.* (Band 148), Nr. 8-9, Seite 589-594.

- (34) Ciacci, C.; Lind, S. E. und Podolsky, D. J. (1993): Transforming growth factor b regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers, *Gastroenterology* (Band 105), Seite 93-101.
- (35) Dignass, A. U. und Podolsky, D. K. (1993): Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta, *Gastroenterology* (Band 105), Nr. 5, Seite 1323-1332.
- (36) Dignass, A. U.; Stow, J. L. und Babyatsky, M. W. (1996): Acute epithelial injury in the rat small intestine in vivo is associated with expanded expression of transforming growth factor alpha and beta, *Gut* (Band 38), Nr. 5, Seite 687-693.
- (37) Mayer, L. (1997): Review article: Local and systemic regulation of mucosal immunity, *Aliment.Pharmacol.Ther.* (Band Suppl 3), Seite 81-85.
- (38) Monteleone, G.; Kumberova, A.; Croft, N. M.; McKenzie, C.; Steer, H. W. und MacDonald, T. T. (2001): Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease, *J.Clin.Invest* (Band 108), Nr. 4, Seite 601-609.
- (39) Wakefield, L. M.; Roberts, A. B.; Assoian, R. K.; Fanger, B. O.; Masui, T.; Lechner, J. F.; Harris, C. C. und Sporn, M. B. (1986): Structure and function of transforming growth factor-beta, *Proc.West Pharmacol.Soc.* (Band 29:475-7.), Seite 475-477.
- (40) Dignass, A. U. und Sturm, A. (2001): Peptide growth factors in the intestine, *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* (Band 13), Nr. 7, Seite 763-770.
- (41) Sturm, A. und Dignass, A. U. (2002): Modulation of gastrointestinal wound repair and inflammation by phospholipids, *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1582), Nr. 1-3, Seite 282-288.
- (42) Daaka, Y. (2002): Mitogenic action of LPA in prostate, *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1582), Nr. 1-3, Seite 265-269.
- (43) Huang, M. C.; Graeler, M.; Shankar, G.; Spencer, J. und Goetzl, E. J. (2002): Lysophospholipid mediators of immunity and neoplasia, *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1582), Nr. 1-3, Seite 161-167.
- (44) Fukushima, N.; Ishii, I.; Contos, J. J.; Weiner, J. A. und Chun, J. (2001): Lysophospholipid receptors, *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* (Band 41:507-34.), Seite 507-534.

- (45) Guidot, D. M.; Bursten, S. L.; Rice, G. C.; Chaney, R. B.; Singer, J. W.; Repine, A. J.; Hybertson, B. M. und Repine, J. E. (1997): Modulating phosphatidic acid metabolism decreases oxidative injury in rat lungs, *Am.J.Physiol* (Band 273), Nr. 5 Pt 1, Seite L957-L966.
- (46) Rice, G. C.; Brown, P. A.; Nelson, R. J.; Bianco, J. A.; Singer, J. W. und Bursten, S. (1994): Protection from endotoxic shock in mice by pharmacologic inhibition of phosphatidic acid, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 91), Nr. 9, Seite 3857-3861.
- (47) Fabia, R.; Ar'Rajab, A.; Willen, R.; Andersson, R. und Bengmark, S. (1993): Effect of putative phospholipase A2 inhibitors on acetic acid-induced acute colitis in the rat, *Br.J.Surg.* (Band 80), Nr. 9, Seite 1199-1204.
- (48) Bone, R. C. (1992): Phospholipids and their inhibitors: a critical evaluation of their role in the treatment of sepsis, *Crit Care Med.* (Band 20), Nr. 6, Seite 884-890.
- (49) Stack, W. A.; Jenkins, D.; Vivet, P. und Hawkey, C. J. (1998): Lack of effectiveness of the platelet-activating factor antagonist SR27417A in patients with active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. The Platelet Activating Factor Antagonist Study Group in Ulcerative Colitis, *Gastroenterology* (Band 115), Seite 1340-1345.
- (50) Moolenaar, W. H. (1995): Lysophosphatidic acid signalling, *Curr.Opin.Cell Biol.* (Band 7), Nr. 2, Seite 203-210.
- (51) Hasegawa, N.; Oka, Y.; Nakayama, M.; Berry, G. J.; Bursten, S.; Rice, G. und Raffin, T. A. (1997): The effects of post-treatment with lisofylline, a phosphatidic acid generation inhibitor, on sepsis-induced acute lung injury in pigs, *Am.J.Respir.Crit Care Med.* (Band 155), Nr. 3, Seite 928-936.
- (52) Waxman, K.; Daughters, K.; Aswani, S. und Rice, G. (1996): Lisofylline decreases white cell adhesiveness and improves survival after experimental hemorrhagic shock, *Crit Care Med.* (Band 24), Nr. 10, Seite 1724-1728.
- (53) van Furth, A. M.; Verhard-Seijmonsbergen, E. M.; van Furth, R. und Langermans, J. A. (1997): Effect of lisofylline and pentoxifylline on the bacterial-stimulated production of TNF-alpha, IL-1 beta IL-10 by human leucocytes, *Immunology* (Band 91), Nr. 2, Seite 193-196.

- (54) Bauditz, J.; Haemling, J.; Ortner, M.; Lochs, H. und Schreiber, S. (1997): Treatment with tumour necrosis factor inhibitor oxpentifylline does not improve corticosteroid dependent chronic active Crohn's disease, *Gut* (Band 40), Seite 470-474.
- (55) Sturm, A.; Zeeh, J.; Sudermann, T.; Rath, H.; Gerken, G. und Dignass, A. U. (2002): Lisofylline and lysophospholipids ameliorate experimental colitis in rats, *Digestion* (Band 66), Nr. 1, Seite 23-29.
- (56) Fiocchi, C. (1997): The immune system in inflammatory bowel disease, *Acta Gastroenterol.Belg.* (Band 60), Nr. 2, Seite 156-162.
- (57) Pallone, F.; Fais, S.; Squarcia, O.; Biancone, L.; Pozzilli, P. und Boirivant, M. (1987): Activation of peripheral blood and intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn's disease. In vivo state of activation and in vitro response to stimulation as defined by the expression of early activation antigens, *Gut* (Band 28), Nr. 6, Seite 745-753.
- (58) Kugathasan, S.; Willis, J.; Dahms, B. B.; O'Riordan, M. A.; Hupertz, V.; Binion, D. G.; Boyle, J. T. und Fiocchi, C. (1998): Intrinsic hyperreactivity of mucosal T cells to interleukin-2 in pediatric Crohn's disease, *J.Pediatr.* (Band 133), Nr. 5, Seite 675-681.
- (59) Boirivant, M.; Marini, M.; Di Felice, G.; Pronio, A. M.; Montesani, C.; Tersigni, R. und Strober, W. (1999): Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis, *Gastroenterology* (Band 116), Nr. 3, Seite 557-565.
- (60) Ina, K.; Itoh, J.; Fukushima, K.; Kusugami, K.; Yamaguchi, T.; Kyokane, K.; Imada, A.; Binion, D. G.; Musso, A.; West, G. A.; Dobrea, G. M.; McCormick, T. S.; Lapetina, E. G.; Levine, A. D.; Ottaway, C. A. und Fiocchi, C. (1999): Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance, *J.Immunol.* (Band 163), Nr. 2, Seite 1081-1090.
- (61) Itoh, J.; de La, Motte C.; Strong, S. A.; Levine, A. D. und Fiocchi, C. (2001): Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease, *Gut* (Band 49), Nr. 1, Seite 35-41.
- (62) Sturm, A.; Leite, A. Z.; Jacobberger, J. W. und Fiocchi, C. (2002): Distinct cell cycle kinetics, clonal expansion and caspase activity differentiate the replicative

potential of lamina propria T-cells (LPT) in Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), *Gastroenterology* (Band 122), Seite A1049.

(63) Moolenaar, W. H. (1991): Mitogenic action of lysophosphatidic acid, *Adv.Cancer Res.* (Band 57:87-102.), Seite 87-102.

(64) Sturm, A.; Becker, A.; Schulte, K. M.; Goebell, H. und Dignass, A. U. (1998): Lysophosphatidic acid modulates intestinal epithelial cell function in vitro, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (Band 859:223-6.), Seite 223-226.

(65) Sturm, A.; Sudermann, T.; Schulte, K. M.; Goebell, H. und Dignass, A. U. (1999): Modulation of intestinal epithelial wound healing in vitro and in vivo by lysophosphatidic acid, *Gastroenterology* (Band 117), Nr. 2, Seite 368-377.

(66) Elson, C. O.; Sartor, R. B.; Tennyson, G. S. und Riddell, R. H. (1995): Experimental models of inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* (Band 109), Nr. 4, Seite 1344-1367.

(67) Cario, E.; Becker, A.; Sturm, A.; Goebell, H. und Dignass, A. U. (1999): Peripheral blood mononuclear cells promote intestinal epithelial restitution in vitro through an interleukin-2/interferon-gamma-dependent pathway, *Scand.J.Gastroenterol.* (Band 34), Nr. 11, Seite 1132-1138.

(68) Godaly, G.; Hang, L.; Frendeus, B. und Svanborg, C. (2000): Transepithelial neutrophil migration is CXCR1 dependent in vitro and is defective in IL-8 receptor knockout mice, *J.Immunol.* (Band 165), Nr. 9, Seite 5287-5294.

(69) Lenardo, M. J. (1997): The molecular regulation of lymphocyte apoptosis, *Semin.Immunol.* (Band 9), Nr. 1, Seite 1-5.

(70) De Maria, R.; Boirivant, M.; Cifone, M. G.; Roncaioli, P.; Hahne, M.; Tschopp, J.; Pallone, F.; Santoni, A. und Testi, R. (1996): Functional expression of Fas and Fas ligand on human gut lamina propria T lymphocytes. A potential role for the acidic sphingomyelinase pathway in normal immunoregulation, *J.Clin.Invest* (Band 97), Nr. 2, Seite 316-322.

(71) Hengartner, M. O. (2000): The biochemistry of apoptosis, *Nature* (Band 407), Nr. 6805, Seite 770-776.

- (72) Kennedy, N. J.; Kataoka, T.; Tschopp, J. und Budd, R. C. (1999): Caspase activation is required for T cell proliferation, *J.Exp.Med.* (Band 190), Seite 1891-1896.
- (73) Sturm, A.; Schulte, C.; Schatton, R.; Becker, A.; Cario, E.; Goebell, H. und Dignass, A. U. (2000): Transforming growth factor-beta and hepatocyte growth factor plasma levels in patients with inflammatory bowel disease, *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* (Band 12), Nr. 4, Seite 445-450.
- (74) Hauser, H. und Lipka, G. (1994): Lipid Dynamics in Brush Border Membrane, Hoekstra, D., *Lipid Dynamics in Brush Border Membrane*, Seite 167-195, Academic Press, San Diego.
- (75) Angel, I.; Bar, A. und Haring, R. (2002): Bioactive lipids and their receptors, *Curr.Opin.Drug Discov.Devel.* (Band 5), Nr. 5, Seite 728-740.
- (76) Chapman, D. (1974): Biological membranes, *Biomembranes.* (Band 4A), Nr. 0, Seite 123-158.
- (77) Kemeny, L. und Ruzicka, T. (1994): Lipidmediatoren, *Hautarzt* (Band 45), Seite 582-591.
- (78) Moolenaar, W. H.; van der Bend, R. L.; van Corven, E. J.; Jalink, K.; Eichholtz, T. und van Blitterswijk, W. J. (1992): Lysophosphatidic acid: a novel phospholipid with hormone- and growth factor-like activities, *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* (Band 57:163-7.), Seite 163-167.
- (79) van Corven, E. J.; van Rijswijk, A.; Jalink, K.; van der Bend, R. L.; van Blitterswijk, W. J. und Moolenaar, W. (1992): mitogenic action of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid on fibroblasts, *Biochem J* (Band 181), Seite 163-169.
- (80) Durieux, M. E. und Lynch, K. R. (1993): Signalling properties of lysophosphatidic acid, *Trends Pharmacol.Sci.* (Band 14), Nr. 6, Seite 249-254.
- (81) Bursten, S.; Weeks, R.; West, J.; Le, T.; Wilson, T.; Porubek, D.; Bianco, J. A.; Singer, J. W. und Rice, G. C. (1994): Potential role for phosphatidic acid in mediating the inflammatory responses to TNF alpha and IL-1 beta, *Circ.Shock* (Band 44), Nr. 1, Seite 14-29.

- (82) Coon, M. E.; Diegel, M.; Leshinsky, N. und Klaus, S. J. (1999): Selective pharmacologic inhibition of murine and human IL-12-dependent Th1 differentiation and IL-12 signaling, *J.Immunol.* (Band 163), Nr. 12, Seite 6567-6574.
- (83) Clarke, E.; Rice, G. C.; Weeks, R. S.; Jenkins, N.; Nelson, R.; Bianco, J. A. und Singer, J. W. (1996): Lisofylline inhibits transforming growth factor beta release and enhances trilineage hematopoietic recovery after 5-fluorouracil treatment in mice, *Cancer Res.* (Band 56), Nr. 1, Seite 105-112.
- (84) Willerford, D. M.; Chen, J.; Ferry, J. A.; Davidson, L.; Ma, A. und Alt, F. W. (1995): Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment, *Immunity.* (Band 3), Nr. 4, Seite 521-530.
- (85) Beverly, B.; Kang, S. M.; Lenardo, M. J. und Schwartz, R. H. (1992): Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation, *Int.Immunol.* (Band 4), Nr. 6, Seite 661-671.
- (86) Baum, L. G.; Pang, M.; Perillo, N. L.; Wu, T.; Delegeane, A.; Uittenbogaart, C. H.; Fukuda, M. und Seilhamer, J. J. (1995): Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells, *J.Exp.Med.* (Band 181), Nr. 3, Seite 877-887.
- (87) Deem, R. L.; Shanahan, F. und Targan, S. R. (1991): Triggered human mucosal T cells release tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma which kill human colonic epithelial cells, *Clin.Exp.Immunol.* (Band 83), Nr. 1, Seite 79-84.
- (88) Elson, C. O. (1989): Specialized receptors for antigens on gut epithelial T cells, *Gastroenterology* (Band 97), Nr. 5, Seite 1341-1342.
- (89) Joseph, N. E.; Fiocchi, C. und Levine, A. D. (1997): Crohn's disease and ulcerative colitis mucosal T cells are stimulated by intestinal epithelial cells: implications for immunosuppressive therapy, *Surgery* (Band 122), Nr. 4, Seite 809-814.
- (90) Mahida, Y. R.; Galvin, A. M.; Gray, T.; Makh, S.; McAlindon, M. E.; Sewell, H. F. und Podolsky, D. K. (1997): Migration of human intestinal lamina propria lymphocytes, macrophages and eosinophils following the loss of surface epithelial cells, *Clin.Exp.Immunol.* (Band 109), Nr. 2, Seite 377-386.
- (91) Mennechet, F. J.; Kasper, L. H.; Rachinel, N.; Li, W.; Vandewalle, A. und Buzoni-Gatel, D. (2002): Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with

murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen, *J.Immunol.* (Band 168), Nr. 6, Seite 2988-2996.

(92) Amundson, S. A.; Myers, T. G. und Fornace, A. J., Jr. (1998): Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress, *Oncogene* (Band 17), Nr. 25, Seite 3287-3299.

(93) Fridman, J. S. und Lowe, S. W. (2003): Control of apoptosis by p53, *Oncogene* (Band 22), Nr. 56, Seite 9030-9040.

(94) Boirivant, M.; Pica, R.; DeMaria, R.; Testi, R.; Pallone, F. und Strober, W. (1996): Stimulated human lamina propria T cells manifest enhanced Fas-mediated apoptosis, *J.Clin.Invest* (Band 98), Nr. 11, Seite 2616-2622.

(95) Scaffidi, C.; Medema, J. P.; Krammer, P. H. und Peter, M. E. (1997): FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b, *J.Biol.Chem.* (Band 272), Nr. 43, Seite 26953-26958.

(96) Levine, A. D. und Fiocchi, C. (2001): Regulation of life and death in lamina propria T cells, *Semin.Immunol.* (Band 13), Nr. 3, Seite 195-199.

(97) Fiocchi, C. (1998): Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis, *Gastroenterology* (Band 115), Nr. 1, Seite 182-205.

(98) Duchmann, R.; Schmitt, E.; Knolle, P.; Meyer zum Buschenfelde, K. H. und Neurath, M. (1996): Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12, *Eur.J.Immunol.* (Band 26), Nr. 4, Seite 934-938.

(99) Ueyama, H.; Kiyohara, T.; Sawada, N.; Isozaki, K.; Kitamura, S.; Kondo, S.; Miyagawa, J.; Kanayama, S.; Shinomura, Y.; Ishikawa, H.; Ohtani, T.; Nezu, R.; Nagata, S. und Matsuzawa, Y. (1998): High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis, *Gut* (Band 43), Nr. 1, Seite 48-55.

(100) Gett, A. V. und Hodgkin, P. D. (1998): Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 95), Nr. 16, Seite 9488-9493. URL: PM:9689107

(101) Richter, A.; Lohning, M. und Radbruch, A. (1999): Instruction for cytokine expression in T helper lymphocytes in relation to proliferation and cell cycle progression, *J.Exp.Med.* (Band 190), Nr. 10, Seite 1439-1450.

(102) Jonuleit, H.; Schmitt, E.; Stassen, M.; Tuettenberg, A.; Knop, J. und Enk, A. H. (2001): Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood, *J.Exp.Med.* (Band 193), Nr. 11, Seite 1285-1294.

(103) Fiocchi, C. (1991): Production of inflammatory cytokines in the intestinal lamina propria, *Immunol.Res.* (Band 10), Nr. 3-4, Seite 239-246.

(104) Hodes, R. J. (1999): Telomere length, aging, and somatic cell turnover, *J.Exp.Med.* (Band 190), Nr. 2, Seite 153-156.

(105) Hodes, R. J.; Hathcock, K. S. und Weng, N. P. (2002): Telomeres in T and B cells, *Nat.Rev.Immunol.* (Band 2), Nr. 9, Seite 699-706.

(106) Blasco, M. A.; Funk, W.; Villeponteau, B. und Greider, C. W. (1995): Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA, *Science* (Band 269), Nr. 5228, Seite 1267-1270.

(107) Buys, C. H. (2000): Telomeres, telomerase, and cancer, *N.Engl.J.Med.* (Band 342), Nr. 17, Seite 1282-1283.

(108) Appay, V. und Rowland-Jones, S. L. (2002): Premature ageing of the immune system: the cause of AIDS?, *Trends Immunol.* (Band 23), Nr. 12, Seite 580-585.

(109) Cottliar, A.; Fundia, A.; Boerr, L.; Sambuelli, A.; Negreira, S.; Gil, A.; Gomez, J. C.; Chopita, N.; Bernedo, A. und Slavutsky, I. (2000): High frequencies of telomeric associations, chromosome aberrations, and sister chromatid exchanges in ulcerative colitis, *Am.J.Gastroenterol.* (Band 95), Nr. 9, Seite 2301-2307.

(110) Fiocchi, C. (1997): Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions, *Am.J.Physiol* (Band 273), Nr. 4 Pt 1, Seite G769-G775.

(111) Schonbeck, U. und Libby, P. (2001): The CD40/CD154 receptor/ligand dyad, *Cell Mol.Life Sci.* (Band 58), Seite 4-43.

(112) Danese, S.; de La, Motte C.; Sturm, A.; Vogel, J. D.; West, G. A.; Strong, S. A.; Katz, J. A. und Fiocchi, C. (2003): Platelets trigger a CD40-dependent inflammatory response in the microvasculature of inflammatory bowel disease patients, *Gastroenterology* (Band 124), Nr. 5, Seite 1249-1264.

- (113) Heits, F.; Stahl, M.; Ludwig, D.; Stange, E. F. und Jelkmann, W. (1999): Elevated serum thrombopoietin and interleukin-6 concentrations in thrombocytosis associated with inflammatory bowel disease, *J. Interferon Cytokine Res.* (Band 19), Seite 757-760.
- (114) Morowitz, D. A.; Allen, L. W. und Kirsner, J. B (1968): Thrombocytosis in chronic inflammatory bowel disease, *Ann. Intern. Med.* (Band 68), Seite 1013-1021.
- (115) Binion, D. G.; West, G. A.; Ina, K.; Ziats, N. P.; Emancipator, S. N. und Fiocchi, C. (1997): Enhanced leukocyte binding by intestinal microvascular endothelial cells in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* (Band 112), Nr. 6, Seite 1895-1907.
- (116) Laroux, F. S. und Grisham, M. B. (2001): Immunological basis of inflammatory bowel disease: role of the microcirculation, *Microcirculation* (Band 8), Seite 283-301.
- (117) Vogel, J. D.; West, G. A.; Danese, S.; de La, Motte C.; Phillips, M. H.; Strong, S. A.; Willis, J. und Fiocchi, C. (2004): CD40-mediated immune-nonimmune cell interactions induce mucosal fibroblast chemokines leading to T-cell transmigration, *Gastroenterology* (Band 126), Nr. 1, Seite 63-80.
- (118) Nicholson, D. W. (2000): From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents, *Nature* (Band 407), Seite 810-816.
- (119) Thames, H. D.; Petersen, C.; Petersen, S.; Nieder, C. und Baumann, M. (2002): Immunohistochemically detected p53 mutations in epithelial tumors and results of treatment with chemotherapy and radiotherapy. A treatment-specific overview of the clinical data, *Strahlenther. Onkol.* (Band 178), Nr. 8, Seite 411-421.
- (120) Hupp, T. R.; Lane, D. P. und Ball, K. L. (2000): Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer, *Biochem. J.* (Band 352 Pt 1:1-17.), Seite 1-17.
- (121) Shimada, H.; Matsubara, H. und Ochiai, T. (2002): p53 gene therapy for esophageal cancer, *J. Gastroenterol.* (Band 37 Suppl 14:87-91.), Seite 87-91.
- (122) Gudkov, A. V. und Komarova, E. A. (2003): The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy, *Nat. Rev. Cancer* (Band 3), Nr. 2, Seite 117-129.

(123) Swisher, S. G. und Roth, J. A. (2002): Clinical update of Ad-p53 gene therapy for lung cancer, Surg.Oncol.Clin.N.Am. (Band 11), Nr. 3, Seite 521-535.

(124) Jerry, D. J.; Minter, L. M.; Becker, K. A. und Blackburn, A. C. (2002): Hormonal control of p53 and chemoprevention, Breast Cancer Res. (Band 4), Nr. 3, Seite 91-94.

**Danksagung**

Mein Dank gilt allen, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg beruflich und privat unterstützt haben. An erster Stelle möchte ich meinem Freund und Lehrer, Herrn Prof. Dr. med. Axel Dignass, Oberarzt an der Med. Klinik m.S. Hepatologie, Gastroenterologie, Ernährung und Stoffwechsel an der Charité, CVK, danken. Herr Prof. Dignass hat mich bereits in meinem ersten Jahr der klinischen Ausbildung in seine Arbeitsgruppe aufgenommen, mein Interesse an experimentellen Arbeiten geweckt und mir gezeigt, wie man wissenschaftliche Fragestellungen selbständig formuliert und bearbeitet. Nach meiner Rückkehr aus den USA konnten wir unsere Zusammenarbeit in Berlin in einer gemeinsamen Arbeitsgruppe fortführen. Nur durch seine stetige und uneigennützigte Förderung war meine klinische und wissenschaftliche Arbeit möglich.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Claudio Fiocchi, Direktor der gastroenterologischen Forschungsgruppe an der Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio. In seinem Labor konnte ich während meines mehr als zweijährigen wissenschaftlichen Aufenthaltes ein umfangreiches Repertoire molekular- und zellbiologischer Methoden erlernen. Durch seine sehr sorgfältige Art zu arbeiten hat er mich gelehrt, wissenschaftlich zu arbeiten, meine Fehler immer geduldig ertragen und meine Untersuchungen fördernd begleitet.

Mein Dank gilt meinen beiden Chefs, Herrn Prof. Dr. Bertram Wiedenmann und Herrn Prof. Dr. Harald Goebell. Herr Prof. Wiedenmann, Direktor der Med. Klinik m.S. Hepatologie, Gastroenterologie, Ernährung und Stoffwechsel an der Charité, CVK, Berlin, hat mich nach meiner Rückkehr aus den USA in seine Abteilung aufgenommen und den Aufbau meiner Arbeitsgruppe aktiv unterstützt. Durch seine engagierte Unterstützung konnte ich rasch in Deutschland wieder Fuß fassen und meine experimentellen Arbeiten fortsetzen. Herr Prof. Goebell, em. Direktor der Abteilung für Gastroenterologie, Universitätsklinikum Essen, war mein erster Chef. Schon früh empfahl er mir, wissenschaftlich tätig zu sein, gab mir meine wissenschaftliche Ausrichtung und unterstützte mich ständig auf meinem Weg durch die klinische und wissenschaftliche Ausbildung in seiner Abteilung.

Danken möchte ich allen Kollegen in den verschiedenen Forschungslaboratorien in Essen, Cleveland und Berlin, durch deren Mithilfe und konstruktive Diskussionsbereitschaft ein wesentlicher Beitrag zum Gelingen der

experimentellen Untersuchungen geliefert wurde. Danken möchte ich auch für die großzügige Unterstützung durch die Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Ich möchte mich auch bei meiner Frau Astrid bedanken, die mich kontinuierlich unterstützt hat und meinen beiden Kindern Anna und Maximilian, die viele Stunden auf mich verzichten mussten. Last but not least möchte ich meinen Eltern danken, die mich jederzeit liebevoll unterstützt haben und aus mir gemacht haben, was ich bin.

**Lebenslauf**

29. August 1968 Geburt in Düsseldorf
- 1974 - 1978 kath. Grundschule Flottmannstraße, Herne
- 1978 - 1987 Otto-Hahn-Gymnasium, Herne
- Juni 1987 Abitur, Note: 2,3
- 1987 - 1994 Studium für Humanmedizin an der RWTH Aachen
- Juni 1994 3. Staatsexamen (Note: sehr gut)  
Gesamtnote ärztliche Prüfung: gut (1,66)
- 8.März 1995 Promotion zu Thema „Stellenwert von Troponin-T in der Diagnostik akuter Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantation“ (Prof. Dr. Hanrath, RWTH Aachen)  
Gesamturteil sehr gut
- 1994 - 1996 Arzt im Praktikum im Zentrum für Innere Medizin, Universitätsklinikum Essen
- 1996 - 1999 Assistenzarzt im Zentrum für Innere Medizin, Abteilung für Gastroenterologie Universitätsklinikum Essen
- 1999 - 2001 Forschungsaufenthalt an der Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio
- seit 1.1.2002 Assistenzarzt, wissenschaftlicher Mitarbeiter Medizinische Klinik m.S. Hepatologie und Gastroenterologie, Charite, CVK, Med. Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin
- Oktober 2002 Anerkennung zum Facharzt für innere Medizin

### **Eidstattliche Erklärung**

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.

### **Genehmigungen**

Alle Tierexperimente sind durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Essen und den Tierschutzbeauftragten genehmigt worden.

Berlin, der 11.02.2004

Dr. Andreas Sturm