

Die Rolle der Apoptose bei chronisch entzündlichen  
Darmerkrankungen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

Diplom-Biologe Matthias Anstätt  
geboren am 02. Juni 1975 in Hamburg

Referentin: Prof. Dr. Bantel

Korreferent: Prof. Dr. Schwinzer

Korreferent: Prof. Dr. Jacobsen

Tag der Promotion: 12.11.2010

## **Inhaltsverzeichnis**

I. Abbildungsverzeichnis	
II. Abkürzungsverzeichnis	
III. Zusammenfassung/Summary	
1. Einleitung .....	1
1.1 Pathophysiologische Bedeutung und Signalwege der Apoptose .....	1
1.2 Die Bedeutung von Treg Zellen in der Immunantwort.....	6
1.3 Die Bedeutung der Apoptose in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen .....	7
1.4 Immunologische Aspekte in der Pathogenese Chronisch Entzündlicher Darmerkrankungen.....	8
1.5 Arbeitshypothese .....	10
2. Material und Methoden .....	11
Geräte .....	12
2.1 Patienten .....	13
2.2. Immunhistologischer Nachweis von Caspasen-Aktivierung und PARP- Spaltung .....	14
2.3 Immunhistologische Doppelfärbungen .....	15
2.4 Immunshistologische Dreifachfärbung .....	16
2.5 Detektion von Caspasen-Aktivierung im Serum.....	17
2.6 Durchflusszytometrische Detektion von Treg Zell-Apoptose .....	17
3. Ergebnisse .....	19
3.1 In Situ Detektion von Caspaseaktivität und PARP-Spaltung im Kolongewebe bei Patienten mit Morbus Crohn.....	19
3.2 Charakterisierung der Lamina propria Zellen mit erhöhter Caspaseaktivierung und Apoptose bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung (CED) .....	20
3.3 Untersuchung der peripheren regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung.....	24
3.4 Untersuchung der Apoptose in peripheren regulatorischen T-Zellen und serologische Detektion von Caspaseaktivierung bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung .....	26
3.5 Analyse der Treg-Apoptose und Serum-Caspase-Aktivität im Verlauf einer anti- TNFalpha Therapie .....	27

3.6 Analyse der Treg Zellzahl und Caspaseaktivität im Verlauf einer anti-TNFalpha Therapie .....	30
4. Diskussion .....	32
5. Literatur.....	38

## **I. Abbildungsverzeichnis**

<b>Abb. 1:</b> Schematische Darstellung des typischen Verlaufs des apoptotischen Zelltodes .....	1
<b>Abb. 2:</b> Schematische Darstellung des typischen Verlaufs des nekrotischen Zelltodes. ....	2
<b>Abb. 3:</b> Todesrezeptor-vermittelter (extrinsischer) Signalweg der Apoptose. ....	4
<b>Abb. 4:</b> Mitochondrialer (intrinsischer) Signalweg der Apoptose.....	5
<b>Abb. 5:</b> Kolon-Gewebeschnitte von gesunden Individuen und Morbus Crohn Patienten auf aktivierte Caspase-7 oder Caspase-gespaltenes PARP .....	19
<b>Abb. 6:</b> Immunhistochemische Analyse von Caspase-3-Aktivierung bzw. Apoptose im Kolongewebe eines Patienten mit aktiver Colitis Crohn. ....	20
<b>Abb. 7:</b> Immunhistochemische Analyse von Caspase-3-Aktivierung bzw. Apoptose im Kolongewebe eines Patienten mit aktiver Colitis Crohn.....	21
<b>Abb. 8:</b> Immunhistochemische Analyse von Caspase-3-Aktivierung bzw. Apoptose im Kolongewebe eines Patienten mit aktiver Colitis Crohn. ....	21
<b>Abb. 9:</b> Immunhistologische Dreifachfärbungen von Gewebeschnitte von einem repräsentativen Kontrollindividuum und einem Morbus Crohn Patienten.....	23
<b>Abb. 10:</b> Prozentualer Anteil peripherer Treg Zellen an CD4+ Zellen von Kontrollindividuen und CED-Patienten. ....	24
<b>Abb. 11:</b> Apoptoserate in peripheren regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa und aktivem Morbus Crohn verglichen mit gesunden Kontrollindividuen .....	26
<b>Abb. 12:</b> Verlauf einer anti-TNFalpha Therapie bei akutem M. Crohn.....	28
<b>Abb. 13:</b> Analyse von therapierten Morbus Crohn Patienten vor und nach anti-TNFalpha Therapie.....	30

---

## II. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
$\alpha$	anti
$\alpha$ -MEM	Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification
$\Delta$ , delta	Deletion
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\Psi$	retrovirals Verpackungssignal
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AIDS	Aquired Immune Deficiency Syndrome
Ak	Antikörper
AMH	Anti Müller Hormon
AMP	Ampicillin
APCs	Antigen-presenting cells (Antigen-präsentierende Zellen)
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BMP	Bone Morphogenic Proteins
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalivirus
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CTL	Cytotoxic T-Lymphocytes (Zytotoxische T-Lymphozyten)
DC	dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNase	Desoxyribonuklease
ENV	Envelope, Retrovirales Protein
et al.	und andere
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FasL	Fas Ligand
FCS	<i>foetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Flourescin Isothiocyanate
GP	Glykoprotein
Gy	Gray
Gzm	Granzym
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpipeazin-N'-2-ethanolsulfonsäure

---

HCl	Salzsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSC	Hematopoietic stem cell (Hämatopoietische Stammzelle)
HSE	Heat Shock Elements
HSP	Heat Shock Protein (Hitzeschockproteine)
HSVtk	Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase
HSZ	Hämatopoietische Stammzelle
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Kb	Kilobase
KM	Knochenmark
LAK	Lymphokin aktivierte Killerzelle
LB	Liquid-Broth Medium
LTR	Long Terminal Repeat
M	Molar
MA	Matrixprotein
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (großer Histokompatibilitätskomplex)
Min	Minimum
min	Minute
ml	Milliliter
MLV	Murine Leukemia Virus
mM	Millimolar
MOI	Multiplicity Of Infection <i>infection</i> (Multiplizität der Infektion)
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
rpm	<i>rotation per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
t	Zeit
T	T-Zelle
TAA	Tumorassoziierte Antigene
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetate EDTA
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TAP	Transporter Associated Protein
TBR	TGF- $\beta$ Receptor

---

TCR	T-Cell Receptor
TE	Tris / EDTA
TET	Tetrazyklin
TG	Transgen
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor (Mitogener Wachstumsfaktor)
Th	T-Helferzelle
Th1/2	T-Helferzelle des Typ 1/2
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TM	melting-Temperatur
TNFalpha	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TRIS	Trishydroxymethylaminomethane
U	Units
u	unit (Einheit)
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	Vergleiche
wt	wild-type (Wildtyp)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

### **III. Zusammenfassung**

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine erhöhte Apoptose von regulatorischen T Zellen (Treg) bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung (CED) vorliegt. In diesem Zusammenhang wurden durchflusszytometrische Analysen von Treg Zellen aus dem peripheren Blut und histologische Untersuchungen am Darmgewebe von Patienten durchgeführt und diese mit dem Material aus gesunden Kontrollindividuen verglichen. Die Frage inwieweit eine anti-TNFalpha Therapie mit Infliximab® die Apoptoserate von Treg Zellen inhibieren kann und somit zu einem Anstieg der Treg Zellzahl führt, war ebenso Teil dieser Arbeit. In diesem Zusammenhang wurde auch evaluiert, ob sich der luminometrische Nachweis von Caspasen-Aktivierung im Serum für das Monitoring des Therapieansprechens eignet.

Im Rahmen dieser Studie konnten wir bei CED-Patienten eine erhöhte Apoptoserate von intestinalen und peripheren Treg Zellen sowie eine erhöhte Caspase-3/-7 Aktivität im Serum im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen demonstrieren. Zudem konnten wir zeigen, dass eine erfolgreiche anti-TNFalpha Therapie bei diesen Patienten mit einem Abfall der Apoptoserate und einem Anstieg der peripheren Treg Zellpopulation assoziiert war. Gleichzeitig konnte ein Abfall der Caspasenaktivität im Serum bei erfolgreicher anti-TNFalpha Therapie, die mittels klinischer und laborchemischer Parameter verifiziert wurde, verzeichnet werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine erhöhte Apoptoserate von Treg Zellen in der Pathogenese bei CED eine Rolle spielt. Der Nachweis der Treg Zellapoptose, sowie der Caspaseaktivität im Serum könnten sich möglicherweise als Biomarker für die Verlaufsbeurteilung der Krankheitsaktivität bei CED erweisen.

#### **Schlagwörter:**

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Apoptose

Treg

### **III. Summary**

Inappropriate immune responses contribute to the continuous stimulation of the intestinal immune system in chronic inflammatory bowel disease (IBD). Among several pathogenic factors, a numerical deficiency of regulatory T cells (Treg) has been suggested to lead to an insufficient compensation of chronically activated T lymphocytes. In this study, we investigated whether increased apoptosis contributes to Treg cell deficiency in IBD and whether successful treatment with anti-TNF $\alpha$  is achieved by reducing of Treg cell apoptosis. We demonstrate that patients with active IBD revealed increased apoptosis of local Treg cells in the inflamed mucosa compared to healthy individuals. Moreover, also in the peripheral blood a reduced frequency and increased apoptosis of Treg cells were found and accompanied by elevated caspase activity in the serum. During anti-TNF- $\alpha$  therapy with infliximab Treg cell apoptosis declined in close correlation with elevated peripheral Treg cell numbers and a decrease of caspase activation and disease activity. These data suggest that increased apoptosis of Treg cells plays a potentially important role in the IBD pathogenesis and can be reversed by anti-TNF- $\alpha$  treatment. Measurement of Treg cell apoptosis and serum caspase activity might therefore represent promising tools for monitoring disease activity and treatment response in IBD patients.

**Keywords:**

Inflammatory Bowel Disease

Apoptosis

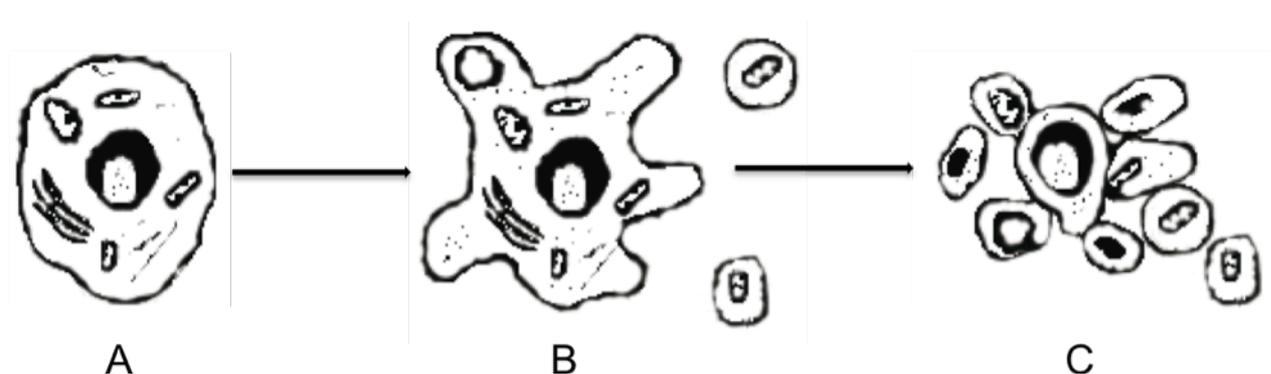
Treg

## 1. Einleitung

### 1.1 Pathophysiologische Bedeutung und Signalwege der Apoptose

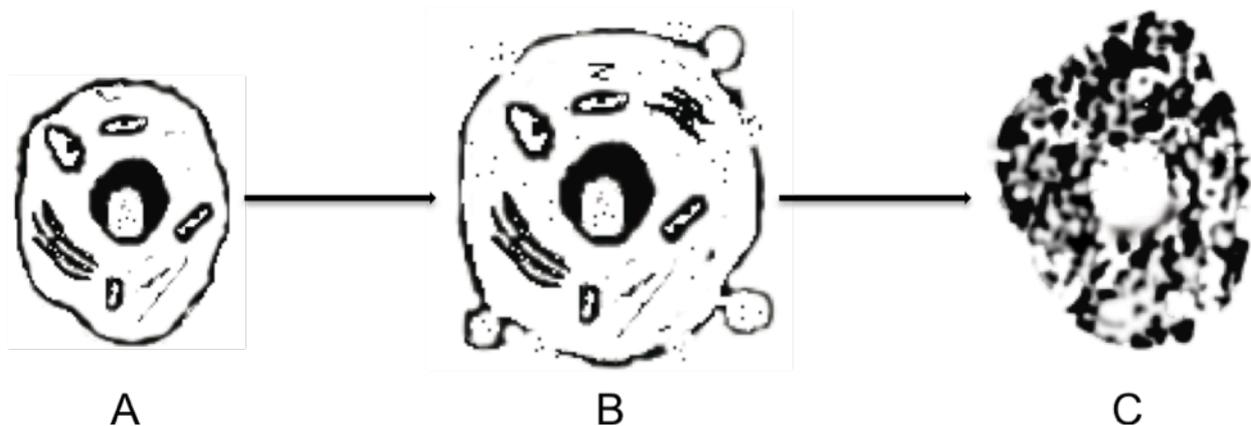
Der apoptotische Zelltod ist ein angeborener Mechanismus, der dazu dient unerwünschte Zellen aus dem Körper zu eliminieren. Zu diesen Zellen zählen u.a. virusinfizierte und transformierte (maligne) Zellen aber auch Zellen des Immunsystems, um beispielsweise Entzündungsprozesse bzw. eine Immunantwort zu terminieren. Eine dysregulierte Apoptose spielt in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen eine Rolle. Eine verminderte Apoptoserate wird beispielsweise bei malignen Erkrankungen beobachtet, während sich chronisch entzündliche Erkrankungen und eine Vielzahl von Autoimmunerkrankungen durch eine erhöhte Apoptoserate auszeichnen (Lorenz, HM. *et al.*, 2000).

Morphologisch ist dieser Zelltod durch eine Verminderung des Zellvolumens gekennzeichnet. Die apoptotische Zelle löst sich von der Nachbarzelle ab. Weiterhin bilden sich auf der Zelloberfläche Vesikel (blebbing) und es kommt zu einer Verdichtung des Chromatins. Schließlich zerfällt die Zelle in apoptotische Körperchen, die von den Phagozyten des Immunsystems erkannt, aufgenommen und abgebaut werden (Abbildung 1).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des typischen Verlaufs des apoptotischen Zelltodes mit Zellschrumpfung (A) und Bildung von apoptotischen Körperchen (B), die von ortsständigen Phagozyten des Immunsystems aufgenommen und abgebaut (phagozytiert) werden (C). modifiziert nach: <http://www.celldeath.de/encyclo/index.html>

Nekrose hingegen wird typischerweise durch Traumen oder Noxen ausgelöst, die zu einer irreversiblen Membranschädigung führt. Dies hat eine Flüssigkeits- und Elektrolytverschiebungen, Schwellung und Lyse der Zelle zur Folge, wobei der Zellinhalt freigesetzt und eine Entzündungsreaktion hervorgerufen wird (Abbildung 2).

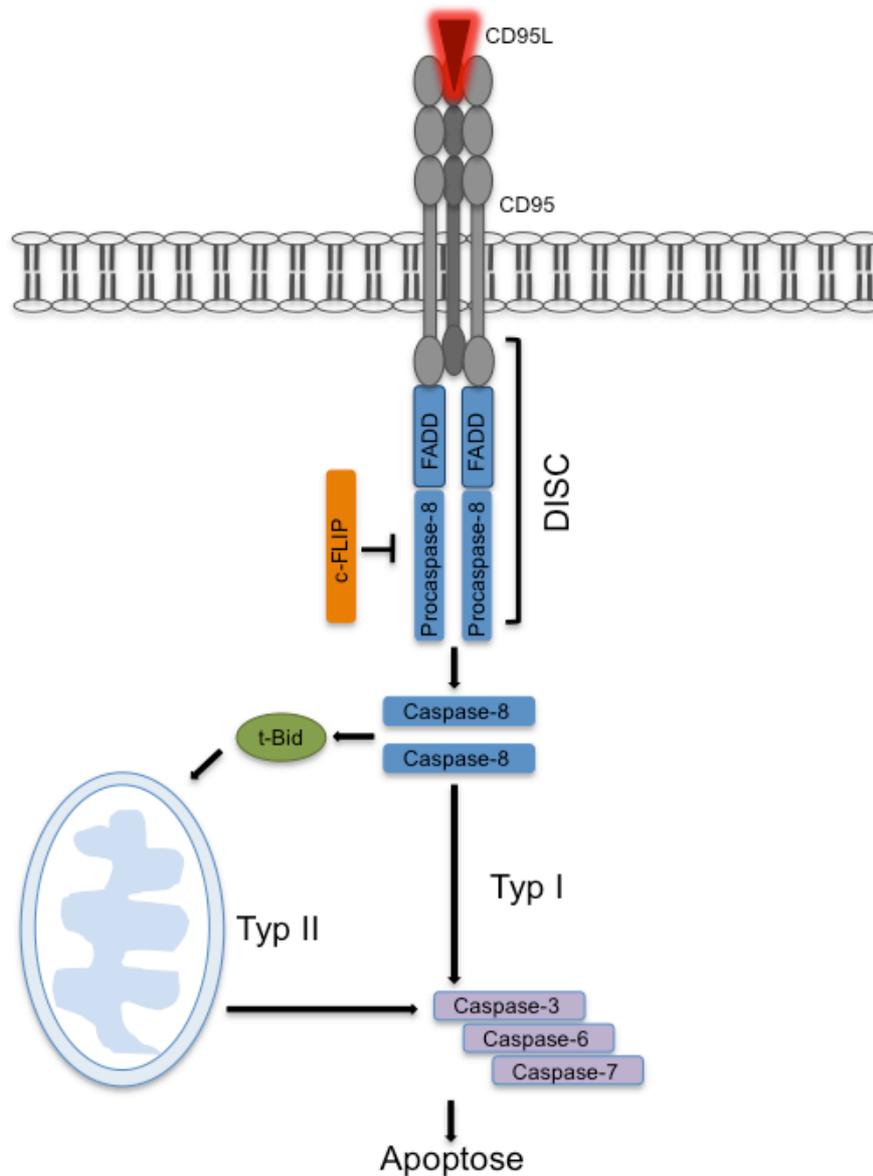


**Abb. 2:** Schematische Darstellung des typischen Verlaufs des nekrotischen Zelltodes. Durch Flüssigkeits- und Elektrolytverschiebungen (A) kommt es zur Zellschwellung (B) und Lyse der Zellen mit Freisetzung des Zellinhaltes (C).  
modifiziert nach: <http://www.celldeath.de/encyclo/index.html>

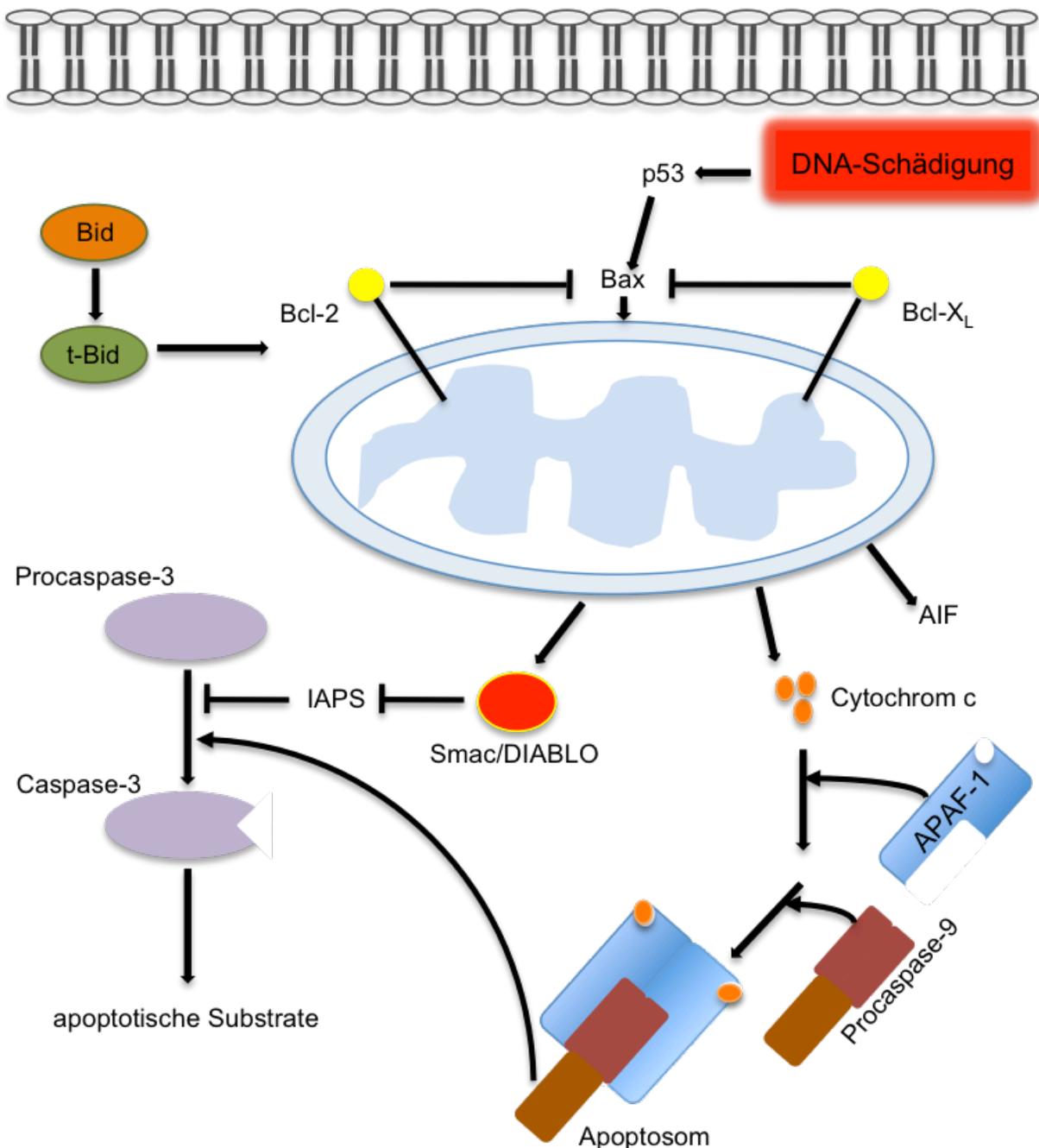
Apoptose kann durch die Bindung spezifischer Liganden an sogenannte Todesrezeptoren (englisch: Death Receptor) induziert werden (Peter, ME., *et al.*, 1999). Zu diesen proapoptotischen Todesrezeptor-Liganden (englisch: Death Receptor; DR-Liganden) zählen beispielsweise der CD95L oder TRAIL (Tumor Necrose Factor Related Inducing Ligand). Dieser durch DR-Liganden-Interaktion induzierte Signalweg wird als extrinsisch bezeichnet. Unterschieden wird dieser von dem sogenannten intrinsischen Apoptosesignalweg, der durch zellulären Stress induziert wird. (Schulze-Osthoff, K., *et al.* 1998; Los, M., *et al.* 1999; Bantel, H., *et al.* 1998). Beide Signalwege aktivieren Cysteinproteasen (Caspasen), die ihre Substrate nach einem Aspartatrest in der P1-Position spalten. Aufgrund ihrer Stellung im Signalweg unterscheidet man zwischen Initiator- (Caspase-8 und -9) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) (Schulze-Osthoff, K., *et al.* 1998). Initiatorcaspasen werden durch ihre Rekrutierung an spezifische Proteinkomplexe (Todesrezeptorkomplex oder Apoptosom) prozessiert und damit aktiviert. Im Falle der CD95- und TRAIL (DR4/DR5)-vermittelten Apoptose setzt sich der

Todesrezeptorkomplex aus der intrazellulären Rezeptorregion, dem Adaptorprotein FADD (englisch: Fas-Associated Protein with Death Domain) sowie der Pro-Caspase-8 zusammen und bilden den DISC (englisch: Death-Inducing-Signaling-Complex) (Ashkenazi, A., *et al.*, 1998). Diese Todesrezeptorkomplexbildung führt zur autoproteolytischen Aktivierung der Initiatorcaspase 8, die durch anti-apoptotische Moleküle wie c-Flip inhibiert werden kann. Ähnlich der Gerinnungskaskade führt die Aktivierung der Initiatorcaspase-8 zur Spaltung und damit Aktivierung einer Reihe nachfolgender Effektorcaspasen. Effektorcaspasen spalten schliesslich eine Vielzahl für die Zell-Funktion und -Integrität wichtiger Substrate und induzieren dadurch den apoptotischen Zelltod. Zellen, die über diesen sogenannten extrinsischen Signalweg sterben, werden Typ-I-Zellen genannt. In sogenannten Typ-II-Zellen ist die über den Todesrezeptorkomplex erfolgte Caspase-8-Aktivierung nicht ausreichend für die Apoptose. In diesen Zellen spielt neben der direkten Caspase-8-induzierten Aktivierung von Effektorcaspasen gleichzeitig die Caspase-8-vermittelte Spaltung und damit Aktivierung des pro-apoptotischen Moleküls Bid eine Rolle (Wilson, NS., *et al.*, 2009). Durch die Interaktion von Caspasen-gespaltenem Bid (englisch: BH3 Interacting Domain Death Antagonist) mit der mitochondrialen Membran wird somit der intrinsische Signalweg aktiviert (Abbildungen 3 und 4). Der mitochondriale Signalweg wird beispielsweise durch DNA-schädigende Einflüsse wie Chemotherapeutika oder ionisierende Bestrahlung induziert. Die so u.a. über p53-abhängige Aktivierung pro-apoptotischer Moleküle wie Bax interagieren mit der mitochondrialen Membran und führen zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren wie Cytochrom C. Ähnlich der Todesrezeptorkomplexbildung im extrinsischen Signalweg wird im intrinsischen Signalweg das sogenannte Apoptosom durch die Interaktion von zytosolischem Cytochrom C, dem Adaptorprotein Apaf-1 und Pro-Caspase-9 gebildet. Entsprechend der Caspase-8-Aktivierung im extrinsischen Signalweg führt die Formation dieser hochmolekularen Proteinkomplexe zur autoproteolytischen Aktivierung, die im intrinsischen Signalweg als Initiatorcaspase fungierenden Caspase-9, die nachfolgend Effektorcaspasen wie Caspase-3, -6 und -7 aktiviert. Wie oben erwähnt, verursachen Effektorcaspasen durch die Spaltung zahlreicher Proteine die biochemischen und morphologischen Veränderungen des Zelltodes. Zu den über 400 Caspasesubstraten zählen unter anderem Proteine der DNA-Replikation, Kontrollproteine des Zellzyklus und Strukturproteine des

Zytoskeletts (z.B. Cytokeratin-18) und Zellkerns (Bantel, H., *et al.*, 2001; Fischer, U., *et al.*, 2003; Vaculova, A. und Zhivotovsky, B., 2008).



**Abb. 3:** Todesrezeptor-vermittelter (extrinsischer) Signalweg der Apoptose. Die Bindung eines spezifischen Liganden an den Todesrezeptor führt zur Todesrezeptorkomplexformation, die sich aus dem Adaptorprotein FADD, Pro-Caspase-8 sowie dem intrazellulären Rezeptoranteil zusammensetzt. Durch diese Komplexbildung kommt es zur autoproteolytischen Aktivierung von Caspase-8, die nachfolgende Effektorcaspasen wie Caspase-3 aktiviert. Effektorcaspasen spalten eine Vielzahl von zellulären Substraten und induzieren somit den apoptotischen Zelltod. In bestimmten Zellen führt aktivierte Caspase-8 zur Spaltung des pro-apoptotischen Moleküls Bid, das über den intrinsischen Signalweg die Aktivierung von Effektorcaspasen verstärkt.



**Abb. 4:** Mitochondrialer (intrinsischer) Signalweg der Apoptose. DNA-Schädigung führt, beispielsweise durch p53 vermittelt, zur Aktivierung des pro-apoptischen Moleküls Bax. Dies führt zur Induktion des intrinsischen Signalweges mit Freisetzung pro-apoptischer Faktoren wie AIF (Apoptose-induzierender Faktor), Smac/DIABLO und Cytochrom-C, die durch anti-apoptische Moleküle wie Bcl-2/Bcl-xl inhibiert werden kann. Cytochrom-C bildet mit dem Adaptormolekül Apaf-1 (englisch: Apoptosis Protease Activating Factor-1) und Pro-Caspase-9 das sogenannte Apoptosom, das zur Aktivierung der Initiatorcaspase-9 mit nachfolgender Aktivierung von Effektorcaspasen wie Caspase-3 führt. Zytosolisches Smac/DIABLO inhibiert dabei anti-apoptische Moleküle der IAP-Familie (englisch: Inhibitor of Apoptosis Protein), die direkt Effektorcaspasen wie Caspase-3-inhibieren.

## 1.2 Die Bedeutung von regulatorischen T Zellen (Treg) in der Immunantwort

T-regulatorische (Treg) Zellen kennzeichnen eine Subpopulation von T-Zellen, die durch die Expression von CD4, CD25 und des zur sog. Forkhead Familie zählenden Transkriptionsfaktors FoxP3 charakterisiert ist und 2-3% an der Gesamt-Lymphozyten-Zahl sowie 7-10% (Taams, LS., *et al.*, 2001) an der CD4-Zellzahl ausmacht.

Tregs lassen sich in natürliche (natural; n-Treg) und in induzierte (i-Tregs) Treg Zellen unterscheiden. Die Treg Zellen bilden einen wichtigen Bestandteil der adaptiven Immunantwort, indem sie den Entzündungsprozess terminieren und eine pathologische Immunantwort und damit die Entstehung von Autoimmun- und chronisch entzündlichen Krankheiten verhindern.

Die T-Zell-Differenzierung in Treg Zellen wird durch Antigen-vermittelte T-Zellrezeptorstimulation induziert. Dabei kommt es u.a. zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT, der die FoxP3 Expression induziert (Mantel, PY., *et al.*, 2006; Wu, Y. *et al.*, 2006). Weiterhin produzieren Treg Zellen anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und Transforming Growth Factor (TGF) beta, die wiederum die FoxP3 Expression induzieren (Levings, MK., *et al.*, 2005; Fu, S., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass durch anti-TGFbeta oder anti-IL10-Antikörper die Treg Zellfunktion aufgehoben werden kann (Nakamura, K., *et al.*, 2001). FoxP3 wird eine Relevanz in der Suppression der Immunantwort zugeordnet (Bluestone, JA., *et al.*, 2005; Green, EA., *et al.*, 2003; Belkaid, Y., *et al.*, 2002; Coombes, JL., *et al.*, 2005). Beispielsweise reguliert FoxP3 die Expression von Genen, die die T-Zellrezeptoraktivierung inhibieren (Schubert, LA., *et al.*, 2001; Wu, Y., *et al.*, 2006). Die Bedeutung von FoxP3 für die Immunregulation wird durch die Beobachtung, dass FoxP3-defiziente Mäuse ein lymphoproliferatives Autoimmun-Syndrom entwickeln (Scurfy Mice; Lahl, K., *et al.*, 2007) und Patienten mit angeborener Immundysregulation wie dem immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked (IPEX) Syndrom Mutationen im Foxp3-Gen aufweisen, weiter evident (Hori, S. und Sakaguchi, S., 2004).

Die Treg Zell-Homöostase wird primär durch IL-2, IL-4, IL-10 und TGFbeta aufrechterhalten. Die Dysregulation einzelner Komponenten führt zu einer Verschiebung und somit zu krankhaften Veränderungen des Gesamtorganismus. Der

Vergleich gesunder und an IPEX erkrankter Probanden zeigte, dass selbstreaktive T-Zellen auch in den gesunden Menschen vorliegen und nur das Gleichgewicht zwischen autoreaktiven T-Zellen und deren Suppression durch Tregs eine Autoimmunerkrankung unterbindet (Sakaguchi, S., *et al.*, 2006)

### **1.3 Die Bedeutung der Apoptose in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen**

Eine dysregulierte Apoptose kann Autoimmunerkrankungen begünstigen. Der Verlust von proapoptotischen Proteinen oder die Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie kann zu Autoimmunerkrankungen führen (Merino, D., *et al.*, 2009). Ein Verlust des pro-apoptotischen Moleküls Bim führt beispielsweise zu einer erhöhten Anzahl von Lymphozyten und myeloiden Zellen wie bei Autoimmunerkrankungen beobachtet werden kann (Bouillet, P., *et al.*, 1999, 2002). Bei der Regulation der peripheren T-Zellanzahl sind pro- bzw. antiapoptotische Proteine essentiell. Die Deletion von autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie wurde in verschiedenen Modellen untersucht und es wurde gezeigt, dass diese durch transgene Expression von Bcl-2 als auch durch die genetische Deletion von Bim verhindert werden kann (Hernandez, J., *et al.*, 2001; Davey, GM., *et al.*, 2002; Redmond, WL., *et al.*, 2008). Die apoptotische Eliminierung von Effektor-T-Zellen beendet die Immunantwort und schützt somit vor einer überschiessenden (Auto)Immunreaktion. Wenige Zellen überleben diesen Prozess und werden zu langlebenden Gedächtniszellen, die Bcl-2 zum Überleben benötigen (Matsuzaki, Y., *et al.*, 1997; Veis, DJ., *et al.*, 1993). Somit nehmen pro- wie auch antiapoptotische Prozesse während der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts des Immunsystems entscheidende Positionen ein. Andererseits entstehen durch Apoptose neue Neoepitope, die eine Autoimmunreaktion begünstigen können. Dieser Prozess kann möglicherweise durch eine rasche Phagozytose apoptotischer Zellen verhindert werden.

## 1.4 Immunologische Aspekte in der Pathogenese Chronisch Entzündlicher Darmerkrankungen (CED)

Im gesunden Darm von Menschen und Nagern garantiert eine strikte Balance, zwischen pro- und anti-inflammatorischen Immunantworten, die Beseitigung von Pathogenen und toleriert zugleich die normale Bakterienflora. Eine Störung dieser immunologischen Toleranz scheint in genetisch empfänglichen Individuen eine wichtige Rolle in der Entstehung von chronisch, entzündlichen Darmerkrankungen (CED), wie Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa, zu spielen (Packey, CD. und Sartor RB., 2008). Ergebnisse aus Tiermodellen und humanen Studien zeigen, dass sowohl ein Defekt der Barrierefunktion des Darmepitheliums, als auch eine Dysregulation des mucosalen Immunsystems zu einer CED führen können (McGuckin, MA., *et al.*, 2009; Wehkamp, J., *et al.*, 2008; Mizoguchi, A. und Mizoguchi E., 2008; Torres, MI. und Rios A., 2008). In MC und CU wurde eine erhöhte Anzahl aktivierter, bakterienspezifischer T-Lymphozyten der Darmmucosa gefunden (Sturm, A., *et al.*, 2002). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte eine mangelnde apoptotische Elimination von aktivierten T-Effektor-Zellen sein (Sturm, A. *et al.*, 2002). Zudem könnte eine verminderte regulatorische Aktivität des Darmimmunsystems in der Ausprägung einer CED beteiligt sein (Izcue, A. *et al.*, 2009).

Neuere Studien zeigen, dass regulatorische T-Zellen, welche die Proliferation von aktivierten T-Zellen kontrollieren, in der Krankheitsentstehung von CED involviert sind. (Saruta, M., *et al.*, 2007). Die Bedeutung von Treg Zellen in der intestinalen Homöostase wird unterstrichen durch die Beobachtung, dass immundefiziente Mäuse, die funktionell defekte Treg Zellen aufweisen eine chronisch anhaltende Colitis entwickelten (Veltkamp, C., *et al.*, 2006). Zudem wurde in experimentellen Colitismodellen evident, dass ein Transfer von Treg Zellen vor der Manifestation einer Colitis schützen bzw. eine Remission induzieren kann (Read, S., *et al.*, 2000; Mottet, C., *et al.*, 2003, Veltkamp *et al.*, 2005). Die Bedeutung von Treg Zellen in der immunologischen Kontrolle in CED wird weiter durch die Beobachtung hervorgehoben, dass eine durch Histon/Protein-Deacetylasen (HDACS) induzierte Erhöhung der Treg Zellzahl die Ausprägung einer experimentell-induzierten Colitis reduzierte (Tao, R., *et al.*, 2007). Bei Colitis ulcerosa supprimieren Treg Zellen die

Produktion von  $T_H1$  (z.B. IFN- $\gamma$ , IL-2) und  $T_H2$  (z.B. IL-5, IL-13) Zytokinen, welche von aktivierten T-Zellen freigesetzt werden und tragen damit zur Terminierung des Entzündungsprozesses bei (Yu, QT., *et al.*, 2007). Eine Reduktion der Treg Zellzahl könnte somit Ursache einer verstärkten und prolongierten Entzündungsreaktion sein. Mehrere Studien weisen auf eine im Vergleich zu gesunden Personen reduzierte Anzahl von Treg Zellen bei Patienten mit Morbus Cohn und Colitis ulcerosa hin (Saruta M., *et al.*, 2007; Takahashi, M., *et al.* 2006; Yu, QT., *et al.* 2007). Die Ursache der verminderten Treg Zellzahl bei diesen Patienten bleibt unklar. Kürzlich wurde bei Patienten rheumatoider Arthritis eine erhöhte, spontane Apoptoserate von Treg Zellen beschrieben (Toubi, E., *et al.*, 2005). Eine weitere Studie zeigte, dass eine erfolgreiche anti-TNFalpha Therapie bei diesen Patienten zu einem signifikanten Anstieg der Treg Zellzahl führte, die mit einer Inhibition der T-Zell-vermittelten Zytokinproduktion und der Induktion einer klinischen und laborchemischen (CRP-Normalisierung) Remission assoziiert war (Ehrenstein MR., *et al.*, 2004). Ob eine verstärkte Apoptoserate von Treg Zellen in der Manifestation und Ausprägung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung eine Rolle spielt und welche Bedeutung einer anti-TNFalpha Therapie, die zunehmend erfolgreich bei diesen Patienten eingesetzt wird (Rutgeerts, P., *et al.*, 2009; Schnitzler, F., *et al.* 2009), für die Reduktion der Treg-Zellapoptose zukommt, bleibt unklar.

## 1.5 Arbeitshypothese

Dieser Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass Patienten mit CED eine verminderte Anzahl an Treg Zellen aufweisen, die auf eine verstärkte Apoptose dieser Zellpopulation zurückgeführt wird. Es wurden deshalb Treg Zellen aus Blut und Darmgewebe von Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung, wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, auf Apoptose hin untersucht und mit denen gesunder Probanden verglichen. Dabei wurde auch der Fragestellung nachgegangen inwieweit eine anti-TNFalpha Therapie die Apoptoserate von Treg Zellen inhibieren kann und somit zum Anstieg der Treg Zellzahl führt. In diesem Zusammenhang wurde auch evaluiert, ob sich der serologische Nachweis von Caspasen-Aktivierung für das Monitoring des Therapieansprechens bei Patienten mit CED eignen.

## **2. Material und Methoden**

### **Chemikalien und Reagenzien**

Lösungsmittel	J.T. Baker, Deventer, Holland
Chemikalien	MERCK, Darmstadt, Deutschland
	J.T. Baker, Deventer, Holland
	SIGMA Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll-Plaque <sup>TM</sup> Plus	GE Healthcare
Aquamount, Eindeckmittel	VWR, England
Hämotoxylin-Lösung. Gill No. 1	SIGMA Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Situ Cell Death Detection-Kit	Roche Molecular Biochemicals, Penzberg, Deutschland
Vecstatain Universal ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Caspase-Glo 3/7-Assay	Promega, Madison, USA
DAKO Flourescent Mounting Medium	DAKO, Glostrup, Dänemark
Tissue Tek. Einbettmittel	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
FACS-Färbplatten	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
AnnexinV	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

### **Puffer und Lösungen**

PBS	Gibco®Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TRIS	50mM TRIS, pH 7,5
Citratpuffer	17ml 1M Zitronensäure + 83ml 0,1M Natriumcitrat
NAC-Puffer	12,5ml Essigsäure (11,55ml Eiseesig, ad 1L ddH <sub>2</sub> O), 10ml Natriumacetat, 27,5ml ddH <sub>2</sub> O
Substralösung	4mg AEC (Amino-etyl-carbazole), 500µl DMF (Dimethylformamid) 10ml NAC-Puffer pH 4,9, filtrieren 045µm-Filter, + 0,03% Hydrogenperoxid
Permeabilisierungspuffer, TUNEL	0,1% Triton-X100 in 0,1% Natriumcitrat- Puffer pH 4,7

## Antikörper

### Histologie

anti-CD4	Abcam, Cambridge, MA
anti-CD25	Diatec, Oslo, Norwegen
anti-FoxP3	Abcam, Cambridge, MA
anti-FoxP3-Biotyniliert	eBiosciences, San Diego, CA
anti-active-Caspase-3	Cell Signaling, Beverly, MA
anti-active-Caspase-3	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
anti-active-Caspase-7	Cell Signaling, Beverly, MA
anti-PARP	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
donkey anti-goat	Jackson ImmunoResearchLaboratory Inc
goat anti-mouse	Jackson ImmunoResearchLaboratory Inc
donkey-anti-rabbit	Jackson ImmunoResearchLaboratory Inc

### Durchflusscytometrie

anti-CD4-PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
anti-CD25-APC	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
anti-FoxP3-PE	eBiosciences, San Diego, CA

### Geräte

Zentrifugen	Heraeus, Hanau, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchflusscytometer: BD FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Waagen	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Mikroskop	Olympus / Zeiss

### Software

CellQuest	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
SPSS	SPSS GmbH, München, Deutschland

### 2.1 Patienten

Es wurde die Treg-Apoptose von Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa (n=24, 14 Männer, 10 Frauen, Durchschnittsalter  $39,9 \pm 2,4$  Jahren, Altersspanne 22-65 Jahren) und aktiver Morbus Crohn Erkrankung (n=32, 14 Männer, 18 Frauen, Durchschnittsalter  $36,4 \pm 2,1$  Jahre, Altersspanne 20-62 Jahre) untersucht. Alle Patienten zeigten kein oder nur ein partielles Ansprechen auf immunsuppressive Therapie mit Prednisolone und/oder Azathioprine. Patienten erhielten anti-TNFalpha (Infliximab®) in einer Dosierung von 5mg/kg intravenös in den Wochen 0, Zwei, und Sechs, anschließend erfolgte eine alle acht Wochen Gabe in Kombination mit Azathioprine (2-2,5 mg/kg/Tag). Gesunde Kontrollindividuen (n=10, 5 Männer, 5 Frauen, Durchschnittsalter  $25,7 \pm 0,6$  Jahre, Altersspanne 23-29 Jahren) dienten als Kontrollen.

Seren von 45 Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa (31 Männer, 14 Frauen, Durchschnittsalter  $39,2 \pm 1,9$  Jahre, Altersspanne 19-65 Jahre) und 74 Patienten mit aktiver Morbus Crohn Erkrankung (37 Männer, 37 Frauen, Durchschnittsalter  $34,6 \pm 1,5$ , Altersspanne 18-69) wurden auf Caspase-3/-7 Aktivierung untersucht. 18 gesunde Individuen dienten als Kontrolle (Durchschnittsalter  $28 \pm 5$  Jahre, Altersspanne 23-54).

Bei acht Patienten mit aktiver Crohn-Erkrankung (3 Männer, 5 Frauen, Durchschnittsalter  $37,5 \pm 5,3$  Jahre, Altersspanne 26-71 Jahre) wurde die Treg Zellzahl und serologische Caspaseaktivität während einer anti-TNFalpha Therapie analysiert. Eine aktive Morbus Crohn Erkrankung wurde anhand des CDAI definiert (Crohn's disease activity index)  $>150$  (Best, WR., *et al.*, 1976). Zur Bestimmung einer aktiven Colitis ulcerosa diente der Lichtiger score  $>1$  (Lichtiger, S., *et al.*, 1994).

Die Studie wurde nach den Richtlinien des Ethikkomitees der Medizinischen Hochschule Hannover und der Universität Heidelberg durchgeführt.

## **2.2. Immunhistologischer Nachweis von Caspasen-Aktivierung und PARP-Spaltung**

Biopsien des Colon und Ileum von Patienten mit aktiver, entzündlicher Darmerkrankung (Ileitis Crohn n=5, Colitis Crohn n=3, Culitis ulcerosa n=13) sowie gesundes Colongewebe (n=5) wurden vom Institut für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

Die Gewebeschnitte wurden in Xylol entparaffinisiert und in einer absteigenden Ethanol-Reihe rehydriert. Endogene Peroxidase wurde mit 3% Wasserstoffperoxid in Methanol geblockt. Die Antigenfreilegung erfolgte mittels Trypsinbehandlung (0,05%) für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nachfolgende Waschschrte wurden mit Phosphate-Buffered-Saline (PBS), pH 7,4 durchgeführt. Anschließendes Blocken für eine Stunde mit 1%-iger Rinderserum-Albumin-Lösung diente zur Blockierung unspezifischer Bindungen. Die Schnitte wurden mit Antikörpern gegen aktive Caspase-3 (0,3µg/ml; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland), anti-Caspase-7 (1µg/ml; Cell Signaling, Beverly, MA), oder anti-PARP (0,2µg/ml, Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBS, wurden die Schnitte mit einem biotynilierten Zweitantikörper (20µg/ml) für 30min inkubiert. Die Schnitte wurden danach mehrmals gewaschen und mit einem Avidin-Biotin-Komplex mit konjugierter Meerrettichperoxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA) für eine Stunde inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte mit PBS gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels einer frisch hergestellten Substratlösung (4mg Aminoethylcarbazole (AEC) gelöst in 10ml Natriumacetat-Puffer, pH 4,9, 500 µl Dimethylformamid, 0,03% Wasserstoffperoxid) für 10 Minuten. Die Reaktion wurde mit doppelt destilliertem Wasser abgestoppt.

Nachfolgend wurden die Schnitte mit Hämatoxin gegengefärbt und in Glycerol/Gelantine eingedeckelt.

### 2.3 Immunhistologische Doppelfärbungen

Doppelfärbungen wurden für CD4, CD25 oder FoxP3 und aktive Caspase-3 (Cell Signaling, Beverly, MA) oder TUNEL-Reaktivität, mit Hilfe des in „Situ Cell Death Detection-Kit“ (Roche Molecular Biochemicals, Penzberg, Deutschland), durchgeführt. Die Gewebeschnitte (Morbus Crohn n=8, Colitis ulcerosa n=13, gesunde Kontrollen n=5) wurden entparaffinisiert und die Antigene mit Trypsin (0,05%) für 15 min bei RT freigelegt. Nach waschen mit PBS, pH 7,4, wurden die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur mit 0,1% Triton-X100 in 0,1% Natriumcitrat-Puffer pH 4,7 permeabilisiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Schnitte für eine Stunde bei 37°C mit der TUNEL-Reaktionslösung (200mmol/L Kalium Cacodylat, 25 mmol/l Tris-HCl pH 6,6, 0,2 mmol Ethylendiamintetraazidtriazolensäure und 0,25 mg/mL BSA) bestehend aus der terminalen Deoxynucleotidyltransferase (0,2 U/µl) und Fluoreszin markiertem Deoxyuridintriphosphat (dUTP) inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden dann erneut mit PBS gewaschen und zur Vermeidung von unspezifischer Bindung für 1 Stunde mit 1%-iger BSA-Lösung geblockt. Nach der TUNEL-Färbung wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit anti-CD4 (1:200 verdünnt, Abcam, Cambridge, MA), anti-CD25 (1:200 verdünnt, Diatec, Oslo, Norwegen) oder anti-FoxP3 (1:200 verdünnt, Abcam, Cambridge, MA) inkubiert.

Alternativ zur TUNEL-Färbung erfolgte eine Inkubation mit einem gegen aktive Caspase-3 gerichteten Antikörper (1:200 verdünnt, Cell Signaling, Beverly, MA) entweder zusammen mit anti-CD4, anti-CD25 oder anti-FoxP3 Antikörper (siehe oben) bei 4°C über Nacht.

Nach mehrmaligen Waschen mit PBS wurden die mit TUNEL und anti-CD4, anti-CD25 oder anti-FoxP3 doppelgefärbten Gewebeschnitte für 30 min mit Cy3-konjugierten donkey anti-goat oder goat anti-mouse Zweitantikörpern (Jackson Immuno Research Laboratory Inc., Dianova Hamburg, Deutschland) inkubiert. Die Gewebeschnitte für den Nachweis von aktiver Caspase-3 wurden mit FITC-konjugiertem donkey anti-rabbit bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert, gefolgt mit einer Inkubation des Cy3-konjugierten Antikörpers zur Detektion von CD4, CD25 oder FoxP3 (siehe oben). Abschließend wurde die Gewebeschnitte mit PBS gewaschen und mit DAPI-haltigem Fluoreszenzmedium für den Nachweis von Zellkernen behandelt (Vector Laboratories, Burlingame, USA).

## 2.4 Immunhistologische Dreifachfärbung

Die Dreifachfärbung wurde für CD4, FoxP3 und TUNEL-Reaktivität durchgeführt. Die Gewebeschnitte (Morbus Crohn n=8, Colitis ulcerosa n=13, gesunde Kontrollen n=5) wurden entparaffinisiert und die Antigene durch Kochen für 5 min mit einer Antigen-Unmasking-Solution (H-3300, Vector Laboratories) freigelegt. Anschließend wurden die Schnitte 20 min abgekühlt und in PBS 10 min equilibriert. Zur Vermeidung von unspezifischer Bindung wurden die Schnitte eine Stunde mit 1%-iger BSA-Lösung geblockt. Hiernach erfolgte eine Inkubation mit dem anti-CD4 Antikörper (1:200, Abcam, Cambridge, MA) über Nacht. Nach Waschen mit PBS, wurden die Gewebeschnitte 30 min mit einem Cy5-konjugiertem goat-anti-mouse Zweitantikörper (1:200, Dianova Hamburg, Germany) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 0,1% Triton-X100 in 0,1% Natriumcitrat-Puffer pH 4,7 permeabilisiert. Die Schnitte wurden wiederum in PBS gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem biotyniliertem mouse anti-human FoxP3 Antikörper (clone PCH101, diluted 1:50, eBioscience Inc., San Diego, CA) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit einem Streptavidin-Cy3 Konjugat (1:1000, Dianova Hamburg, Germany) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Schnitte für eine Stunde bei 37°C mit der TUNEL-Reaktionslösung (200mmol/L Kalium Cacodylat, 25 mmol/l Tris-HCl pH 6,6, 0,2 mmol Ethylendiamintetraazidtrionsäure und 0,25 mg/mL BSA) bestehend aus der terminalen Deoxynucleotidyltransferase (0,2 U/μl) und Fluoreszin markiertem Deoxyuridintriphosphat (dUTP) (Roche Molecular Biochemicals, Penzberg, Germany) inkubiert. Abschließend wurde die Gewebeschnitte mit PBS gewaschen und mit DAPI-haltigem Fluoreszenzmedium für den Nachweis von Zellkernen behandelt (Vector Laboratories, Burlingame, USA).

## 2.5 Detektion von Caspasen-Aktivierung im Serum

Die Detektion von aktiver Caspase-3 und -7 erfolgte mit einem in unserem Labor etablierten Lumineszenz-Substrat-Assay (Caspase-Glo™\_Assay, Promega, Mannheim, Deutschland). Dieser auf einer Luciferasereaktion basierte Assay besteht aus einem luminogenen Substrat, welches nach Caspase-vermittelter Spaltung Lichtenergie emittiert, die quantitativ als relative Lichteinheiten (englisch: relative light units: RLU) im Luminometer gemessen werden kann.

Die Seren von Patienten mit entzündlicher Darmerkrankung und gesunden Kontrollprobanden wurden 1:2 in einem Puffer bestehend aus 50mM Tris-HCl pH 7,4, 10mM KCl und 5% Glycerol verdünnt. Danach wurden 10 µl des verdünnten Serums mit 10 µl Caspasesubstrat bei Raumtemperatur inkubiert und anschliessend die Lichtreaktion im Luminometer gemessen. Alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmungen.

## 2.6 Durchflusszytometrische Detektion von Treg Zell-Apoptose

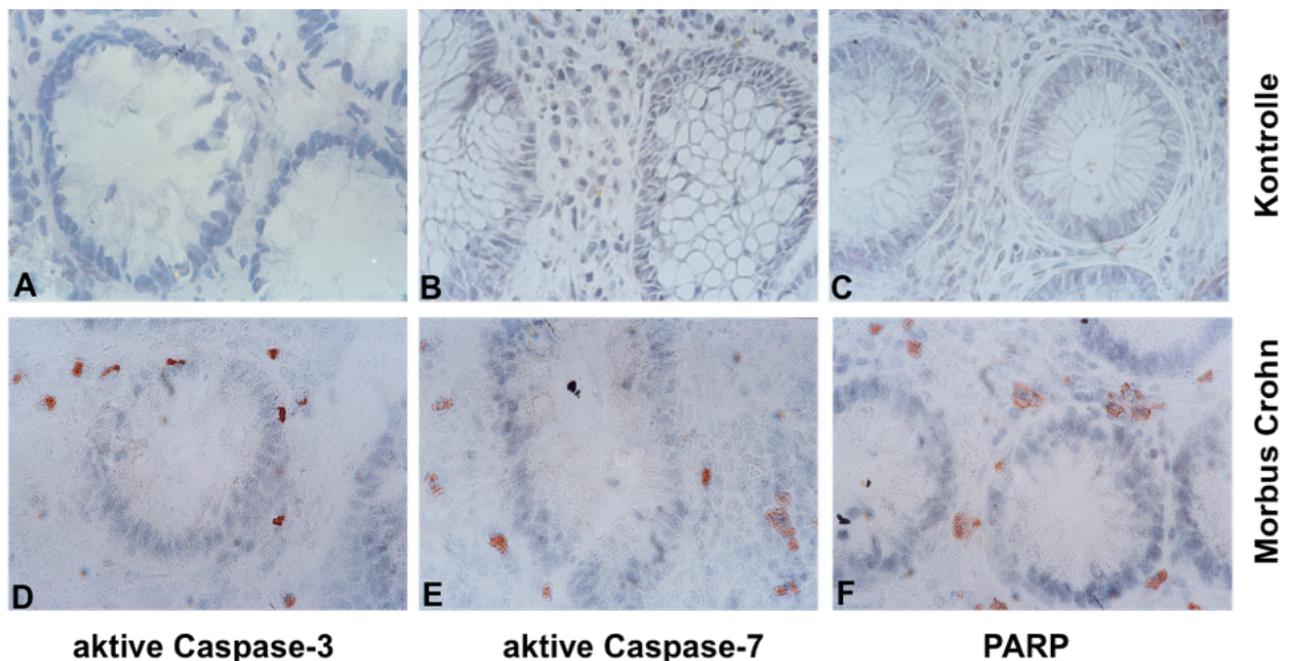
Die Apoptose von Treg Zellen (CD4+/CD25+/FoxP3+) wurde durchflusszytometrisch analysiert. Periphere Mononukleäre Zellen (PBMC) von Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung oder gesunden Probanden wurden in 96 Lochplatten (2x10<sup>6</sup> pro Loch) ausgesät. Die Zellen wurden mit monoklonalen PerCP-konjugiertem anti-CD4 und APC-konjugiertem anti-CD25 Antikörpern (10µl pro Ansatz, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) für 30 Minuten inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 1% BSA in PBS wurden die Zellen mit FITC-konjugiertem Annexin V (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) für 15 Minuten nach Angaben des Herstellers behandelt. Nach weiteren Waschschrritten wurden die Zellen mit einem Permeabilisierungskit über Nacht bei 4°C nach Angaben des Herstellers inkubiert (eBiosciences, San Diego, CA). Nach Permeabilisierung und Waschen erfolgte die Inkubation mit einem PE-konjugierten anti-human FoxP3 Antikörper (eBiosciences, San Diego, CA) für eine Stunde. Abschließend wurden die Zellen mit dem im Kit enthaltenen Puffer gewaschen (siehe oben). Der prozentuale Anteil von CD4+/CD25+/FoxP3+ an Gesamt CD4+ Zellen und der Anteil von CD4+/CD25+/FoxP3+/AnnexinV+ Zellen an den Gesamt CD4+/CD25+/FoxP3+

Zellen wurde mit Hilfe eines FACS Calibur Durchflusszytometers und der Software CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bestimmt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 In Situ Detektion von Caspaseaktivität und PARP-Spaltung im Kolongewebe bei Patienten mit Morbus Crohn

Unkontrollierte Apoptose ist mutmaßlich an der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankung beteiligt. Welche Zellen der entzündeten Darmschleimhaut eine erhöhte Apoptoserate aufweisen ist bislang nur unzureichend bekannt. Wir haben deshalb die Aktivierung von Effektorcaspasen, den Schlüsselenzymen der Apoptose, sowie die caspasebedingte PARP-Spaltung in entzündetem Gewebe von Morbus Crohn Patienten (Ileitis n=5 und Colitis n=3) untersucht. Kolon-Gewebeschnitte gesunder Kontrollpersonen zeigten kaum eine Aktivierung von Caspase-3, Caspase-7, oder eine Spaltung des Caspase-Substrates PARP (Abbildung 5A-C).

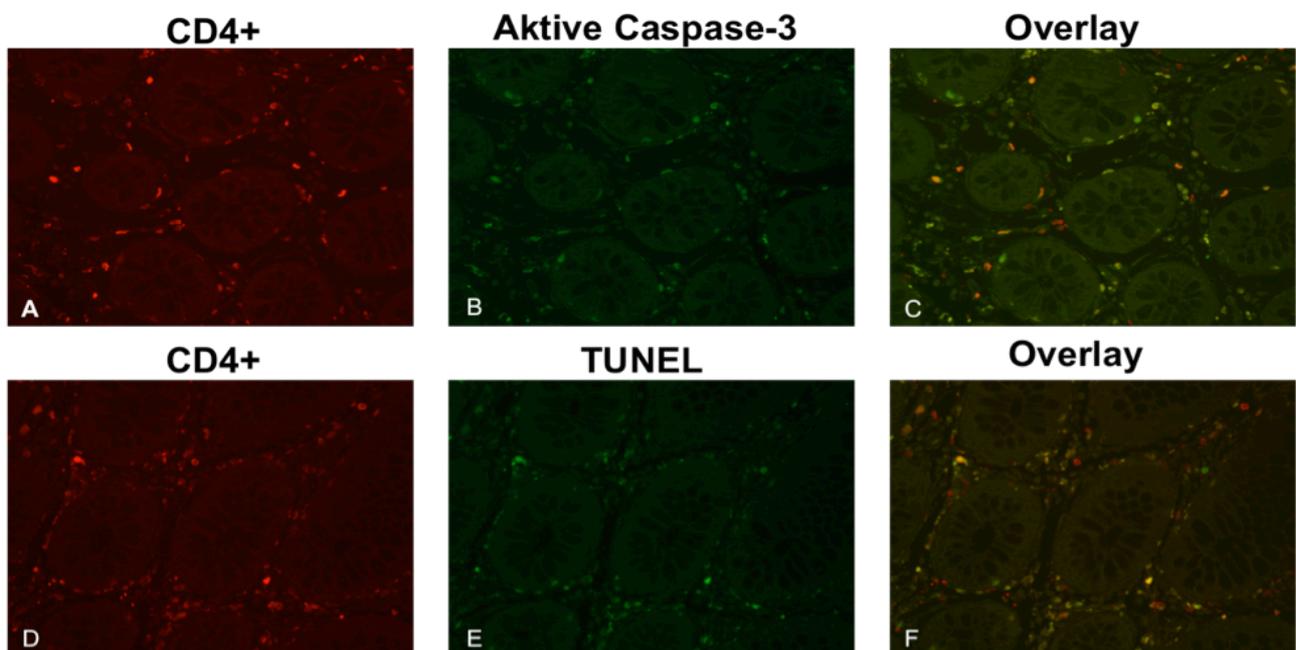


**Abb. 5:** Kolon-Gewebeschnitte von gesunden Individuen (A-C) und Morbus Crohn Patienten (D-F). In der Abbildungen sind dargestellt: aktivierte Caspase-3 (A/D) Zellen (rot) für, aktivierte Caspase-7 (B/E) oder für Caspase-gespaltenes PARP (B/E).

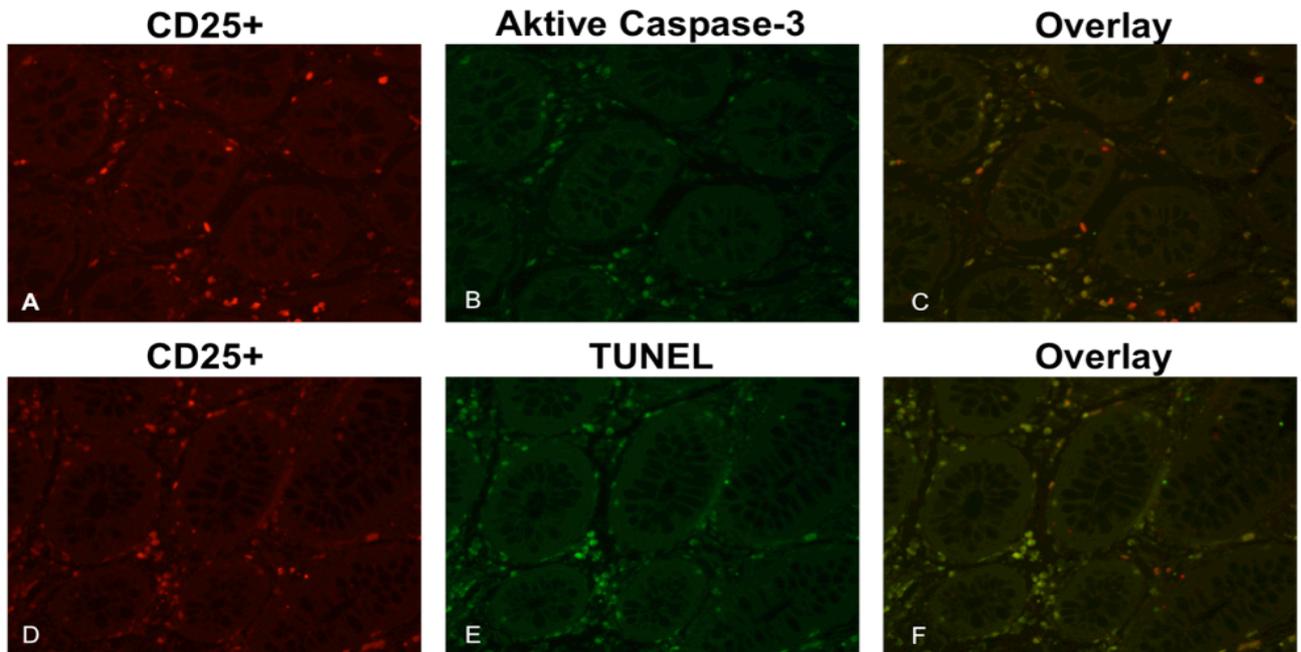
Im Gegensatz zu gesunden Kontroll-Personen zeigte entzündetes Gewebe von Morbus Crohn Patienten positive Färbungen für aktive Caspase-3 und Caspase-7 sowie für Caspasen-gespaltene PARP in Zellen der Lamina propria (Abbildung 6D-F). Aktive Caspase-3 wurde hauptsächlich im Zellkern detektiert, während aktivierte Caspase-7 und Caspasen-gespaltene PARP insbesondere in perinukleären Regionen nachgewiesen wurde. Für aktivierte Caspase-7 wurde bereits in T-Zellen während der Apoptoseinduktion eine Translokation in das endoplasmatische Reticulum beschrieben (Zhivotovsky, B., *et al.*, 1999).

### 3.2 Charakterisierung der Lamina propria Zellen mit erhöhter Caspaseaktivierung und Apoptose bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung (CED)

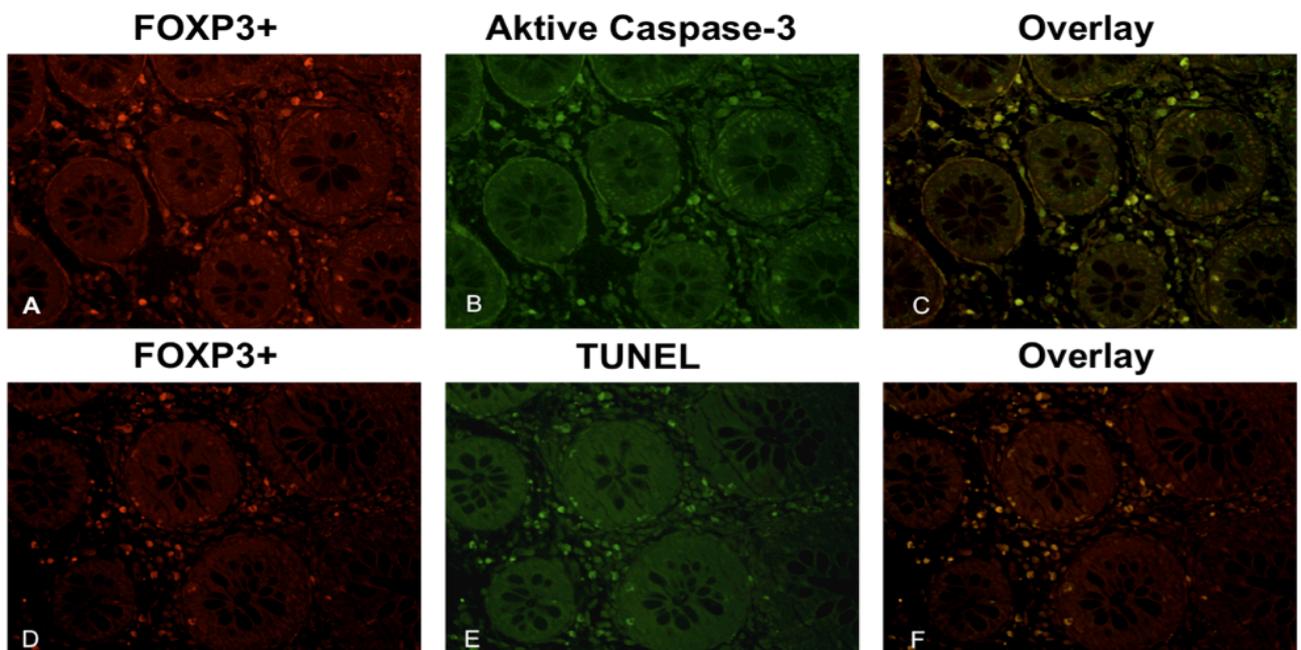
Im weiteren Verlauf der Studie wurden Zellen der Lamina propria in Bezug auf eine erhöhte Caspaseaktivierung und damit verbundenen gesteigerten Apoptoserate hin analysiert. Hierzu wurden immunhistochemisch (Doppelfärbetechnik) in Serienschichten von Patienten mit aktivem M. Crohn (n=8) CD4+ (Abbildung 6), CD25+ (Abbildung 7) oder FoxP3+ (Abbildung 8) positive Zellen identifiziert und diese auf Caspase-3 Aktivierung bzw. Apoptose (TUNEL) untersucht.



**Abb. 6:** Immunhistochemische Analyse von Caspase-3-Aktivierung (B) bzw. Apoptose (TUNEL, E) im Kolongewebe eines Patienten mit aktivem Morbus Crohn (grün), CD4+Zellen (A/D; rot) und doppelpositive (CD4+/Caspase-3+ oder CD4+/TUNEL+) im Overlay gelb dargestellt (C/F). Vergrößerung: 400x



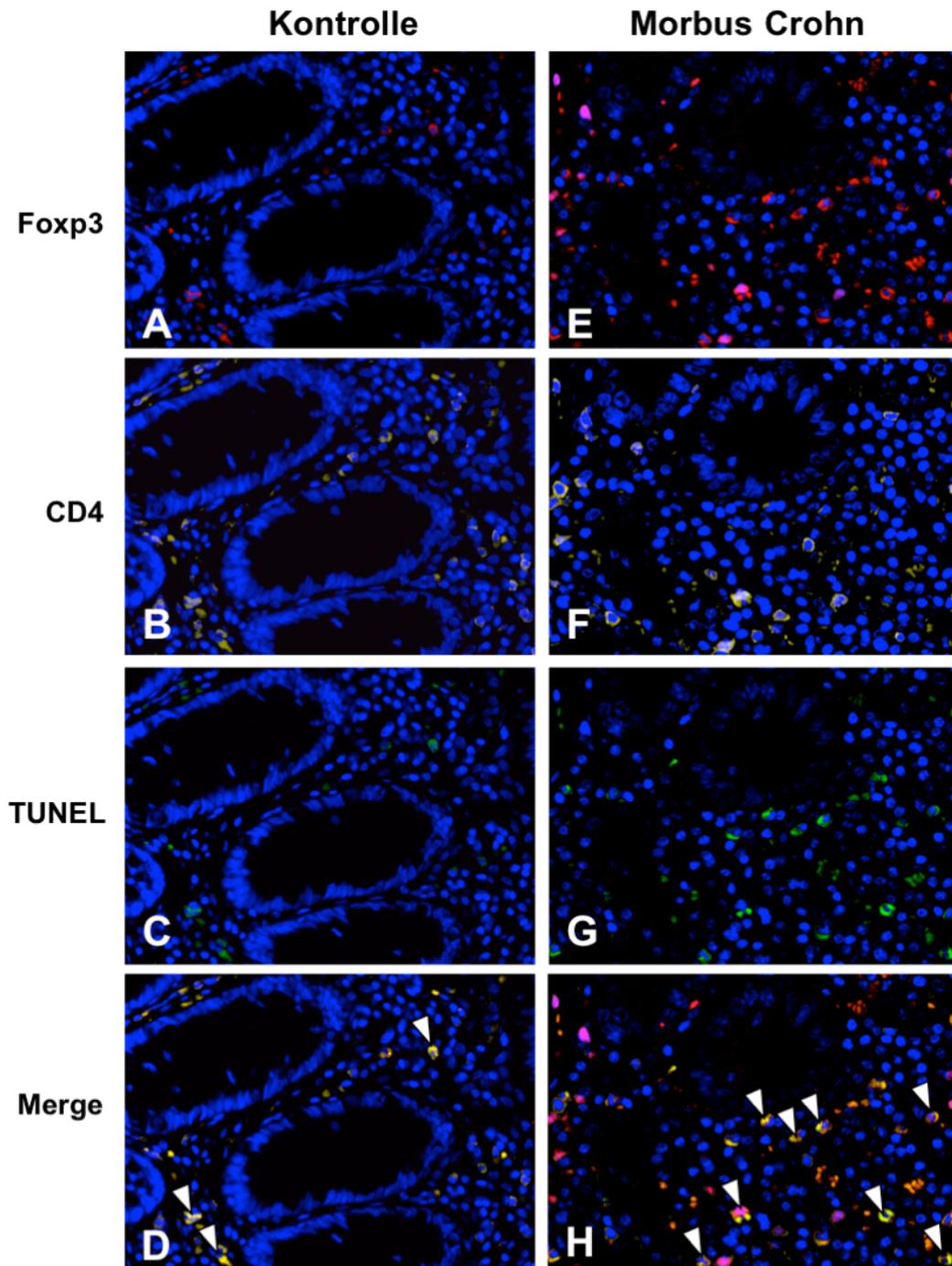
**Abb. 7** Immunhistochemische Analyse von Caspase-3-Aktivierung (B) bzw. Apoptose (TUNEL, E) im Kolongewebe eines Patienten mit aktivem Morbus Crohn (grün), CD25+Zellen (A/D; rot) und doppelpositive (CD25+/Caspase-3+ oder CD25+/TUNEL+) im Overlay gelb dargestellt (C/F). Vergrößerung: 400x



**Abb. 8:** Immunhistochemische Analyse von Caspase-3-Aktivierung (B) bzw. Apoptose (TUNEL, E) im Kolongewebe eines Patienten mit aktivem Morbus Crohn (grün), FoxP3+Zellen (A/D; rot) und doppelpositive (FoxP3+/Caspase-3+ oder FoxP3+/TUNEL+) im Overlay gelb dargestellt (C/F). Vergrößerung: 400x

Wir konnten zeigen, dass Lamina propria infiltrierende CD4<sup>+</sup> (Abbildung 7), CD25<sup>+</sup> (Abbildung 7) und FoxP3<sup>+</sup> (Abbildung 8) regulatorische T-Zellen eine erhöhte Caspase-3 Aktivität (Abbildung 6-8 B,C) und Apoptose (Abbildung 7-9 E,F) in der entzündeten Mucosa von M. Crohn Patienten aufweisen. Ähnliche Ergebnisse wurden in entzündetem Colongewebe von an Colitis ulcerosa (n=13) erkrankten Patienten beobachtet.

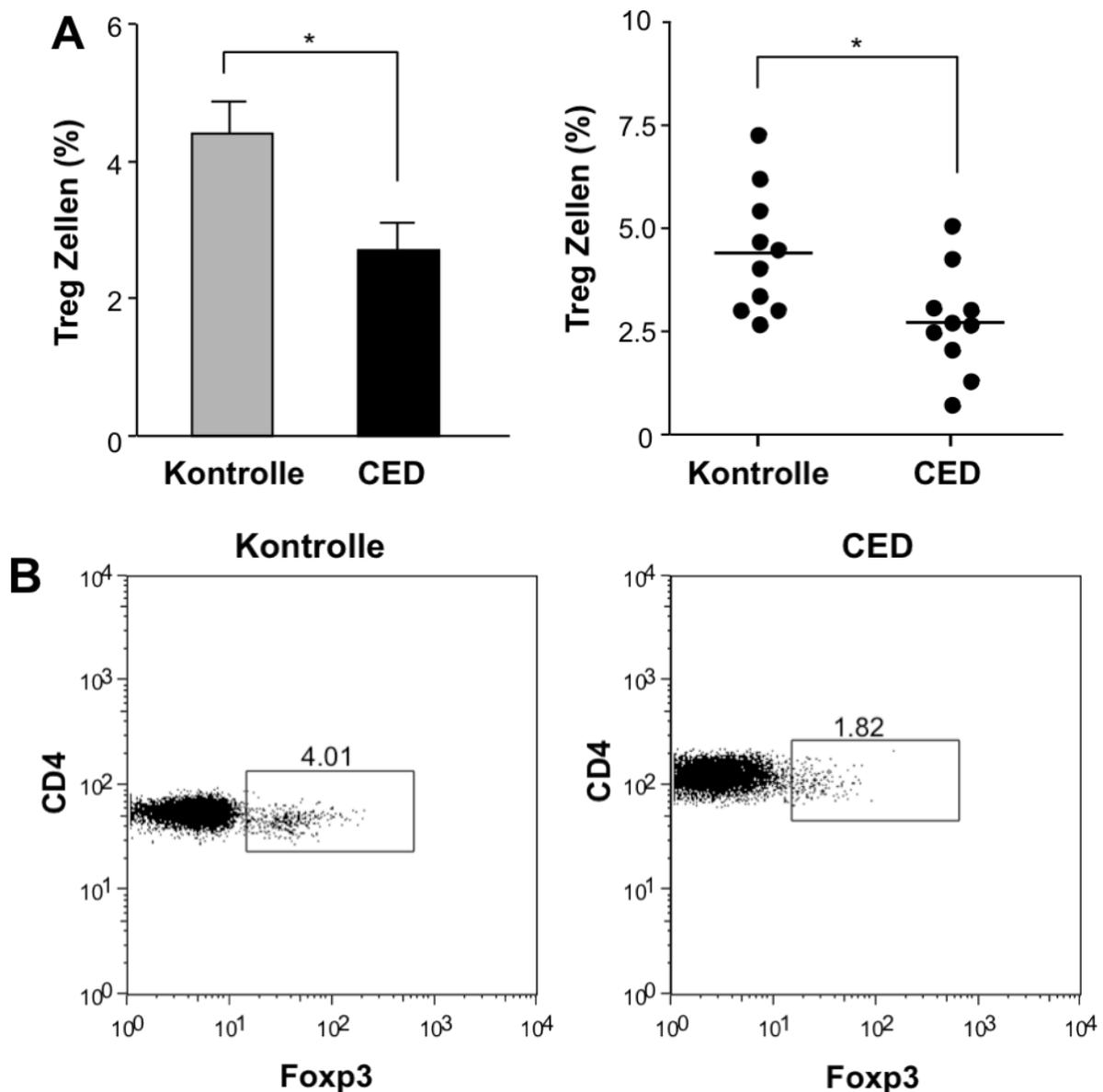
Zur weiteren Charakterisierung des Zelltyps wurden immunhistologische Dreifachfärbungen mit TUNEL zusammen mit anti-CD4 und anti-FoxP3 an Kontroll- bzw. Patientengewebe durchgeführt. gesunde Kontrollbiopsien (n=5) zeigen fast keine Apoptose in den Lamina propia infiltrierenden Zellen (Abbildung 9 A-D). Hingegen konnte eine erhöhte Apoptoserate in den Lamina propia infiltrierenden CD4<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> Zellen bei Morbus Crohn erkrankten Patienten (n=8; Abbildung 9 E-H).



**Abb. 9:** Immunhistologische Dreifachfärbungen von Gewebeschnitte von einem repräsentativen Kontrollindividuum (A-D) und einem Morbus Crohn Patienten (E-H). Die Gewebeschnitte wurden mit DAPI (blau), anti-FoxP3 (rot; A, E), anti-CD4 (gelb; B, F) und TUNEL (grün; C, G) gefärbt. Overlay-Bilder (D,H) zeigen mehr dreifachpositive Zellen (weiße Pfeile) bei CED-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen. Vergrößerung: x400

### 3.3 Untersuchung der peripheren regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung

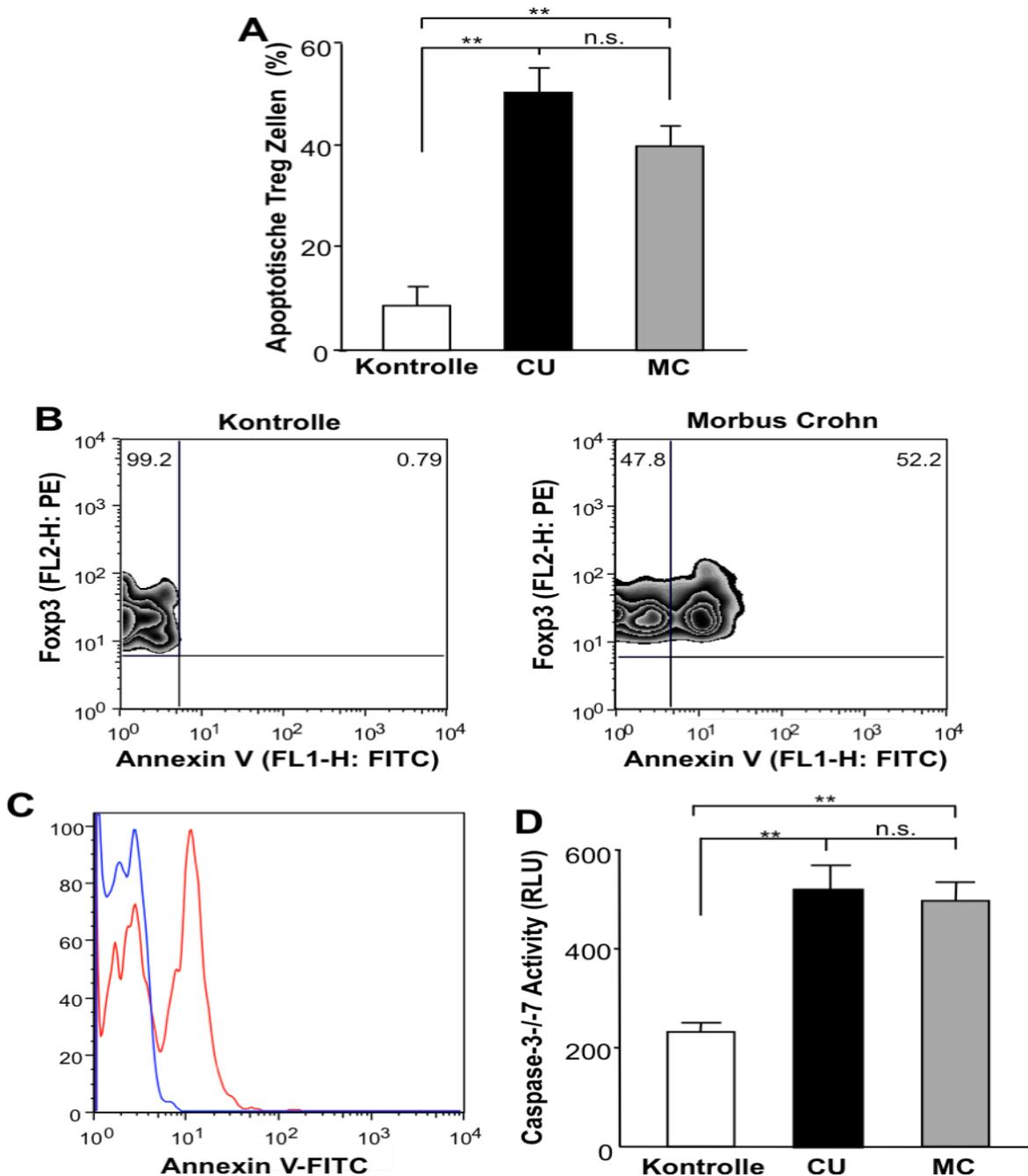
Nachdem eine verstärkte Caspaseaktivierung und Apoptose der regulatorischen T-Zellen in der entzündeten Mucosa bei CED-Patienten gezeigt werden konnte, haben wir zunächst die Anzahl peripherer Tregs (CD4+/CD25+/FoxP3+) in zehn Fällen von CED sowie zehn gesunden Probanden untersucht.



**Abb. 10:** Dargestellt ist der prozentuale Anteil peripherer Treg Zellen an CD4+ Zellen von Kontrollindividuen (n=10) und CED-Patienten (n=10) (A). Die CED-Patienten zeigen eine signifikant verringerte Anzahl peripherer Treg Zellen. Repräsentative durchflußzytometrische Analysen von peripheren Treg Zellen (B). \* = signifikant (p<0,05)

Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung wiesen eine signifikant erniedrigte Anzahl an Tregs ( $2,7 \pm 0,4\%$ ) gegenüber dem gesunden Kontrollkollektiv ( $4,4 \pm 0,5\%$ ) auf (Abbildung 10 A). Representative durchflußzytometrische Analysen von peripheren Treg Zellen von gesunden Personen und Morbus Crohn Patienten sind in Abbildung 10 B dargestellt.

### 3.4 Untersuchung der Apoptose in peripheren regulatorischen T-Zellen und serologische Detektion von Caspaseaktivierung bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung



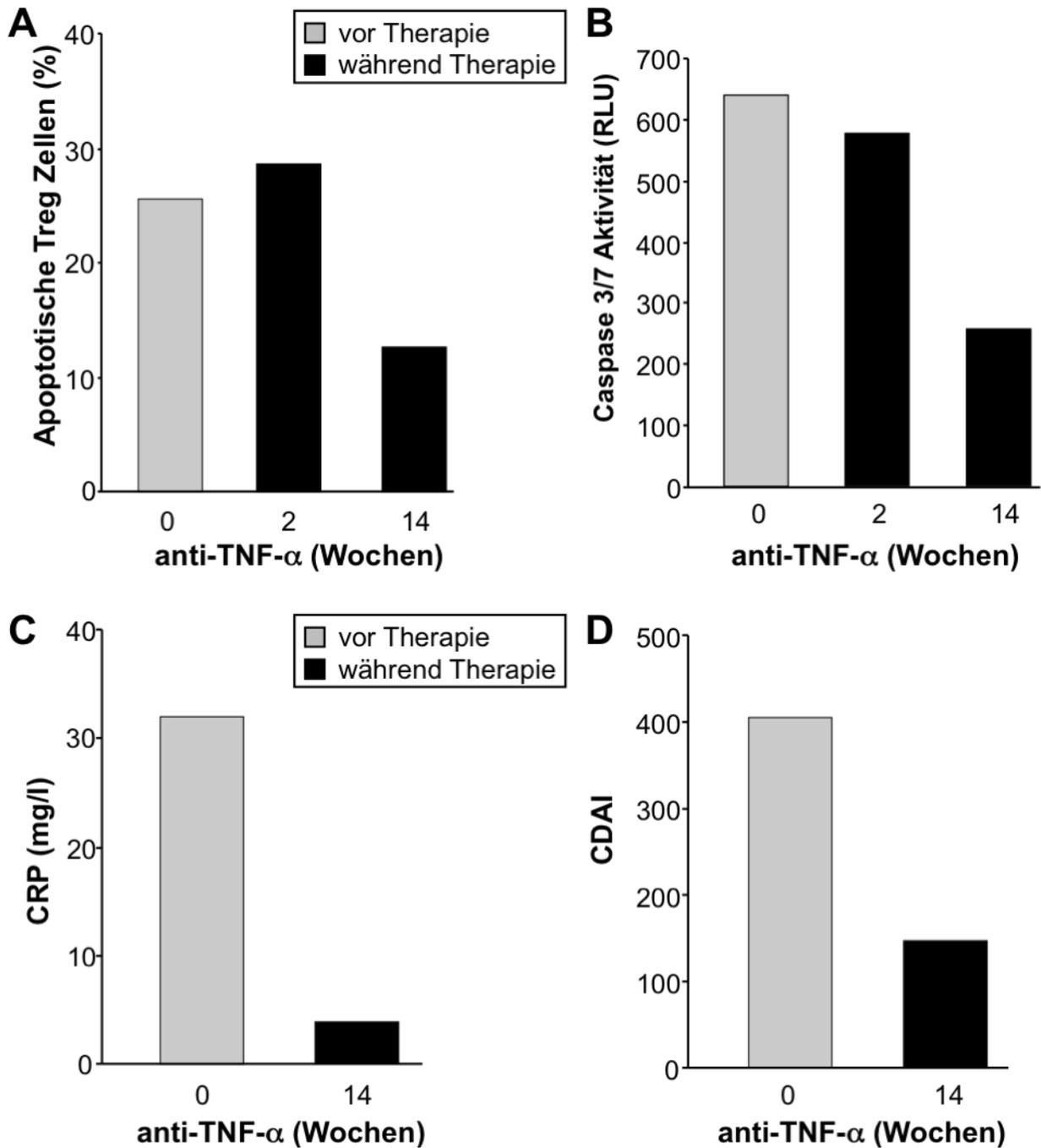
**Abb. 11:** (A) Dargestellt ist die Apoptoserate in peripheren regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa (n=24; 50,5.2±4,8%) und aktivem Morbus Crohn (n=32; 40±4.1%) verglichen mit gesunden Kontrollindividuen (n=10; 8,8±3.8%).(B/C) repräsentative Beispiele durchflußzytometrischer Analysen. Abbildung D zeigt die gemessene Serumcaspase-Aktivität in relativen Lichteinheiten (RLU). Verglichen werden Patienten mit Morbus Crohn (n=74) oder Colitis ulcerosa (n=45) mit gesunden Kontrollindividuen (n=18); 231±17,4 RLU). n.s. = nicht signifikant; \*\* = hoch-signifikant (p<0,01)

In einem weiteren Schritt wurde die Apoptose in peripheren regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit akuter Colitis ulcerosa (n=24) und Morbus Crohn (n=32) mit gesunden Kontrollindividuen (n=10) verglichen (Abbildung 11). Dabei zeigte sich eine hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) verstärkte Apoptoserate peripherer Treg Zellen bei Patienten mit aktiver CED (CU:  $50,5 \pm 4,8\%$ ; MC  $40 \pm 4,1\%$ ) im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen ( $8,8 \pm 3,8\%$ , Abbildung 11A). Representative durchflußzytometrische Analysen von peripheren Treg Zellen von gesunden Personen und Morbus Crohn Patienten sind in Abbildung 11 B,C dargestellt.

Da eine erhöhte Apoptoserate von Tregs mit der Freisetzung von aktivierter Caspase in das Serum assoziiert sein könnte, wurde die Caspaseaktivität in Seren von CED-Patienten und gesunden Probanden untersucht (Abbildung 11D). Hierzu wurden Serumproben mit dem Caspasesubstrat DEVD-Aminoluciferin, welches durch aktive Caspase-3 und Caspase-7 gespalten wird, inkubiert. Anschliessend wurde das in einer Luciferasereaktion entstehende Lumineszenzsignal im Luminometer gemessen. Übereinstimmend mit der erhöhten Apoptoserate in Tregs wiesen Patienten mit Colitis ulcerosa (n=45) oder Morbus Crohn (n=74) eine hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) erhöhte Serumcaspase-Aktivität im Serum ( $517,6 \pm 48,9$  RLU respektive  $496,6 \pm 36,8$  RLU) verglichen mit gesunden Kontrollpersonen (n=18;  $231 \pm 17,4$  RLU) auf (Abbildung 11).

### **3.5 Analyse der Treg-Apoptose und Serumcaspase-Aktivität im Verlauf einer anti-TNFalpha Therapie**

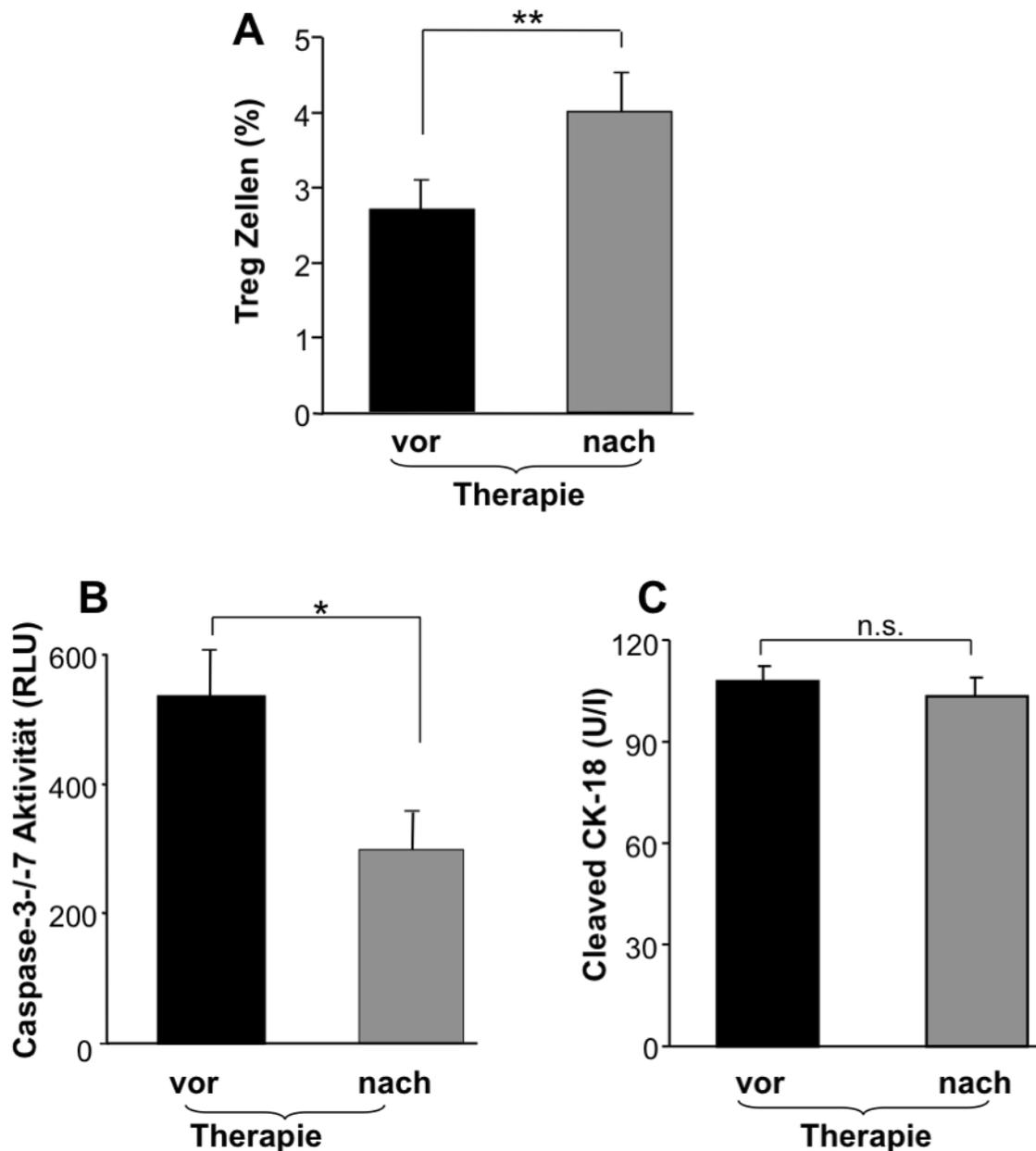
In einem weiteren Schritt dieser Studie wurde die Apoptoserate von Tregs und die Caspaseaktivität in Blutproben von Patienten mit aktivem M. Crohn während einer anti-TNFalpha Therapie untersucht. Ein repräsentatives Beispiel ist in Abbildung 12 dargestellt.



**Abb. 12:** Dargestellt sind der Verlauf der Treg-Apoptose (A) und Serumcaspase-Aktivität (B) sowie des CRPs (C) und des CDAIs (D) im Verlauf (Woche 0, 2, 14) einer anti-TNF $\alpha$  Therapie bei akutem M. Crohn. Der Abfall der Treg-Apoptose und Serumcaspase-Aktivität korreliert mit dem CRP- und CDAI-Abfall. CDAI: Crohn's Disease Activity Index.

In Folge einer Behandlung mit anti-TNFalpha sank die Apoptoserate peripherer Treg Zellen von 25,6% auf 12,6% nach 14 wöchiger Therapie (Abbildung 12A). Die Apoptoserate sank in enger Korrelation mit der serologischen Caspaseaktivität (Abbildung 12B), als auch mit einem Abfall des CRP-Levels (Abbildung 12C) und des CDAI (Abbildung 12D), welche als klinische Marker der Krankheitsaktivität dienten. Dies bedeutet, dass eine erfolgreiche klinische (CDAI) und laborchemische (CRP) Remissionsinduktion mit einem Abfall der Treg Zell-Apoptose und der Serumcaspase-Aktivität einhergeht.

### 3.6 Analyse der Treg Zellzahl und Caspaseaktivität im Verlauf einer anti-TNFalpha Therapie



**Abb. 13:** Darstellung der Analyse von therapierten Morbus Crohn Patienten vor (CDAI>150) und nach Therapie (CDAI<150). Der Anteil der peripheren Treg Zellen ist signifikant nach erfolgreicher anti-TNFalpha Therapie angestiegen ( $p<0,01$ ) (A). Übereinstimmend sank die Serumcaspase-Aktivität von  $531,3\pm 74,6$  RLU auf  $299,8\pm 54,3$  RLU ( $p<0,05$ ) (B), gleichbleibende M30-Werte vor und nach Therapie (C). RLU = Relative Lichteinheiten; U/l = Units pro Liter; \* =  $p<0,05$ ; \*\* =  $p<0,01$

Zur weiteren Bestätigung der bei oben gezeigten Patienten gewonnenen Daten, wurde eine Gruppe von Morbus Crohn Patienten (n=6) vor (CDAI>150) und nach erfolgreicher Therapie (150<CDAI) auf ihre Treg Zellzahl hin untersucht.

Die Analyse der Daten ergab einen hochsignifikanten Anstieg ( $p<0,01$ ) des prozentualen Treg Zell-Anteils ( $4,8\pm 0,5\%$  an CD4+ Zellen) nach anti-TNFalpha Therapie gegenüber dem Wert vor Beginn der Therapie ( $2,7\pm 0,4\%$  an CD4+ Zellen, Abbildung 13A). Übereinstimmend mit dieser Beobachtung sank die Caspaseaktivität (n=8) im Serum ( $299,8\pm 54,3$  RLU) signifikant ( $p<0,05$ ), nach anti-TNFalpha Therapie verglichen mit der Caspaseaktivität vor Therapie ( $531,3\pm 74,6$  RLU) (Abbildung 13B). Zusätzlich wurde durch einen spezifischen ELISA der Serum-Level von Caspase-geschnittenem Cytokeratin-18 (M30 Antigen) bestimmt. Während die Caspaseaktivität in den Seren von CED-Patienten erhöht war und durch eine anti-TNFalpha Therapie verringert wurde, konnten nur ausschließlich normale M30-Werte vor und nach Therapie gemessen werden. Dies deutet daraufhin das eine erhöhte Caspaseaktivität nicht durch Gewebsschädigung von Epithelzellen herrührt (Abbildung 13C). Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse daraufhin, dass eine erhöhte Apoptoserate in Treg Zellen eine potentiell wichtige Rolle in der Pathogenese von CED spielt und durch anti-TNFalpha Behandlung umgekehrt werden kann.

## **4. Diskussion**

Die Pathogenese bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) ist komplex und beinhaltet Defekte der Mucosabarierefunktion und des Immunsystems. Trotz vieler wichtiger Entdeckungen in den letzten Jahren, ist es nicht vollständig verstanden, weshalb die Immunantwort bei CED-Patienten in der Mucosa überreagiert, oder derzeitige medizinische Behandlungen, wie z.B. mit anti-TNFalpha Antikörpern eine Remission der Erkrankung induziert werden kann. Verschiedene neuere Studien haben einheitlich eine Reduktion der peripheren Treg Zellen und einen ungenügenden Anstieg von intestinalen Treg Zellen bei CED-Patienten beschrieben (Maul, J., *et al.*, 2005; Saruta M., *et al.*, 2007, Takahashi M., *et al.*, 2006, Yu QT., *et al.*, 2007), welches die Wichtigkeit dieser T-Zell-Subpopulation in der Pathogenese bei CED nahe legt. Die Relevanz von Treg Zellen bei der intestinalen Homöostase wird unterstrichen durch die Beobachtung, dass immundefiziente Empfängermäuse, welchen man CD4+ T-Zellen ohne CD25+ Population injizierte, eine chronische persistierende Colitis entwickelten (Velkamp, C., *et al.*, 2006).

In dieser Studie wurde die Apoptose von Treg Zellen bei Patienten mit aktiver CED als möglicher Co-Faktor einer verringerten Immunantwort untersucht, die in der Pathogenese der CED diskutiert wird. Während gesunde Individuen kaum Caspase-Aktivierung in der Darm-Mucosa aufweisen, zeigten Lamina propria Zellen von Patienten mit aktivem Morbus Crohn eine verstärkte Caspasen-Aktivierung und Caspasen-vermittelte PARP-Spaltung. Die weitere Charakterisierung führte zur Identifizierung von CD4+FOXP3+ (Treg) Zellen als Mucosa-Subpopulation mit erhöhter Caspasen-Aktivierung und Apoptoserate. Der von Saruta *et al.* und anderen Autoren gegenüber anderen entzündlichen Darmerkrankungen (z.B. Divertikulitis) beschriebene verminderte Anstieg von Treg Zellen in der Darm-Mucosa bei aktiver CED (Saruta M., *et al.*, 2007; Yu QT., *et al.*, 2007). könnte somit auf eine verstärkte Apoptoserate dieser Zellpopulation zurückzuführen sein. Da bisher kein funktionaler Defekt bei CED-Treg Zellen nachgewiesen werden konnte (Maul, J., *et al.*, 2005; Yu QT., 2007; Makita S., 2004; Saruta M., *et al.*, 2007; Kelsen J., *et al.*, 2005) ist davon auszugehen, dass die verringerte Anzahl intestinaler Treg Zellen zur unzureichenden

Terminierung des Entzündungsprozesses bei CED führt. Der Mangel an Treg Zellen könnte dabei auf eine verstärkte Apoptoserate dieser Zellpopulation zurückzuführen sein, wie unsere Daten vermuten lassen. Eine verringerte periphere Treg Anzahl wurde sowohl im Zusammenhang mit aktivem Morbus Crohn (Maul, J., *et al.*, 2005), als mit aktiver Colitis ulcerosa beobachtet, bei der gezeigt wurde, dass die Anzahl der Treg Zellen im peripheren Blut, invers mit der Krankheitsaktivität korreliert (Takahashi M., *et al.*, 2006). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnten wir zum einen eine reduzierte Anzahl von Treg Zellen im peripheren Blut bei CED-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollindividuen nachweisen, die sich jedoch als nicht signifikant erwies. In diesem Zusammenhang konnten wir erstmalig zeigen, dass CED-Patienten eine signifikant höhere Apoptoserate von Treg Zellen des peripheren Blutes im Vergleich zu gesunden Personen aufweisen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass Patienten mit aktiver CED einen ungenügenden Anstieg von Treg Zellen aufgrund einer verstärkten Apoptoserate dieser Zellpopulation aufweisen. Dies könnte auch eine Erklärung für den in unseren Kollektiven von gesunden Individuen und CED-Patienten beobachteten nicht signifikanten Unterschied in der Anzahl peripherer Treg Zellen sein. Es ist somit anzunehmen, dass die verringerte Anzahl zirkulierender Treg Zellen nicht nur die Akkumulation dieser Zellen im Darm widerspiegelt, wie zuvor angenommen wurde (Saruta, M., *et al.*, 2007).

Da aktivierte Caspasen aus apoptotischen Zellen freigesetzt werden und im Serum nachweisbar sind (Seidel, N., *et al.*, 2005, Volkmann, X., *et al.*, 2006), haben wir in einem weiteren Teil unserer Studie Caspasenaktivierung im Serum gesunder Individuen und bei CED-Patienten gemessen. Im Vergleich zu gesunden Kontrollindividuen, beobachteten wir eine erhöhte Caspase-3/-7 Aktivität im Serum von CED-Patienten, welche die erhöhte Treg Zell-Apoptose widerspiegeln könnte. Interessanterweise fanden wir keine erhöhten Werte von Caspase-geschnittenem Cytokeratin-18 (M30 Antigen), welches oft als Serummarker für Apoptose von Epithelzellen eingesetzt wird. Somit implizieren unsere Ergebnisse, dass periphere Treg Zellen nicht nur durch Ihren Efflux in die Mucosa abnehmen, sondern hauptsächlich durch eine erhöhte Apoptoserate.

Da bisher einfache und verlässliche Biomarker für die Beurteilung der Krankheitsaktivität bei CED nicht verfügbar sind, könnte sich der Nachweis von Caspasenaktivierung im Serum zukünftig als nicht invasiver objektiver Biomarker für

die Verlaufsbeurteilung der Krankheitsaktivität und für das Therapie-Monitoring bei CED erweisen.

Unsere Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen bei anderen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis überein, bei der eine erhöhte Apoptoserate der peripheren CD4+CD25+ Zellen verglichen mit gesunden Individuen gezeigt wurde (Toubi, E., *et al.*, 2005). Der Grund für eine erhöhte Apoptosesensitivität von Treg Zellen bei CED und anderen Autoimmunerkrankungen ist bislang nicht erklärt. Beobachtungen in einem experimentellen Maus Colitis Modell zeigte, dass eine inflammatorisch induzierte Depletion von FoxP3+ Treg Zellen im Colon durch CD95/CD95L vermittelte Apoptose verursacht wird (Reardon, C., *et al.*, 2008). In dieser Studie zeigten CD95/CD95L defiziente, jedoch nicht Wildtyp Mäuse mit Colitis eine Treg-Depletion, was darauf hinweist, dass der CD95 Signalweg an der Treg-Homöostase beteiligt ist (Reardon, C., *et al.*, 2008; Mohamood, AS., *et al.*, 2006).

Inwieweit CED-Patienten eine erhöhte CD95-vermittelte Apoptoseempfindlichkeit von Treg Zellen aufweisen wird in weiteren Untersuchungen analysiert.

Unabhängig von einer verstärkten Apoptoserate könnten weitere pathogenetische Mechanismen zu einer verminderten Anzahl von Treg Zellen bei CED beitragen. Hierzu zählen u.a. Defekte in thymusabhängigen Treg Zellentwicklung wie sie bei Tg $\epsilon$ 26 Mäusen beobachtet werden können, die aufgrund eines numerischen und funktionalen Defektes von Treg Zellen eine Colitis entwickeln (Faubion, WA., *et al.*, 2004; Veltkamp, C., *et al.*, 2001). Der Beginn einer Colitis ist bei diesen Mäusen mit einer Involution und einer verringerten Zellularität des Thymus assoziiert. Bei Mäusen, die mit Knochenmarkszellen rekonstituiert wurden, konnte durch die Applikation von anti-TNF $\alpha$  Antikörpern oder Treg Zellen, eine Involution des Thymus verhindert werden, die mit der Entwicklung von funktionalen Treg Zellen im Tg $\epsilon$ 26 Thymus assoziiert war (Faubion, WA., *et al.*, 2004; Veltkamp, C., *et al.*, 2005; Veltkamp, C., *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse deuten auf einen Colitis-induzierten negativen Feed-Back Mechanismus hin, welcher zu einer defekten Produktion von Treg Zellen im Thymus bei genetisch vorbelasteten Individuen führen könnte.

Zahlreiche in vivo Studien belegen einen positiven Effekt durch adoptiven Transfer von Treg Zellen in der Suppression der autoreaktiven T-Zell Antwort. (Lange, C., *et al.*, 2009; DiPaolo, RJ., *et al.*, 2005; Green, EA., *et al.*, 2003; Maloy KJ., *et al.*, 2003; Asano, M., *et al.*, 1996). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass ein

Transfer von Treg Zellen zur Ausheilung einer experimentellen Colitis führte (Mottet, C., *et al.*, 2003; Veltkamp, C., *et al.*, 2005; Elinav, E., *et al.*, 2008; Veltkamp C., *et al.*, 2007; Powrie, F., 2004; Fantini, MC., *et al.*, 2006). Treg Zellen erweisen sich deshalb als vielversprechendes therapeutisches Target bei Autoimmunerkrankungen. Durch den Einsatz von Histon/Protein Deacetylasen (HDACs) konnte beispielsweise die Treg Zellzahl erhöht und die Ausprägung einer Colitis im Mausmodell verringert werden, wodurch die Bedeutung des regulatorisch, immunologischen Anteils in der Pathogenese der CED weiterhin evident wird (Tao, R., *et al.*, 2007; Wang, L., *et al.*, 2009). Somit scheint eine Erhöhung der Treg Zellzahl bei CED-Patienten ein vielversprechender, therapeutischer Ansatz zu sein. Erste klinische Hinweise, dass Treg Zellen die Krankheitsaktivität reduzieren könnten entstammen aus Behandlungsversuchen mit dem probiotischen Cocktail VSL#3, dessen Applikation mit einem Anstieg der Treg Zellzahl in der Lamina propria bei Patienten mit Pouchitis assoziiert war (Pronio, A., *et al.*, 2008). In neueren Studien führte eine anti-TNFalpha Behandlung zu einem signifikanten Anstieg der peripheren Treg Zellen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, welche auf die Therapie ansprachen (Ehrenstein, MR., *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch anti-TNFalpha Therapie die erhöhte Apoptoserate von peripheren CD4+/CD25+ Blutzellen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis verringert werden kann (Toubi E., *et al.*, 2005). Wir konnten erstmalig zeigen, dass bei Morbus Crohn Patienten, welche auf eine anti-TNFalpha Therapie ansprachen, die Apoptoserate peripherer Blut Treg Zellen in enger Korrelation mit der Caspaseaktivität im Serum abfällt. Gleichzeitig war bei diesen Patienten ein Abfall des CRP (C-reaktives Protein) sowie des CDAI (Crohn's disease activity index) als klinischen Marker der Krankheitsaktivität zu verzeichnen. Diese Daten belegen, dass eine erfolgreiche Behandlung bei CED Patienten, d.h. ein Rückgang der inflammatorischen Krankheitsaktivität, mit einem Abfall der Apoptoserate der peripheren Treg Zellen sowie der Caspaseaktivität im Serum assoziiert ist. Die rückläufige Apoptoserate von Treg Zellen während einer erfolgreichen anti-TNFalpha Therapie ging mit einem signifikanten Anstieg der peripheren Treg Zellzahl einher. Diese Ergebnisse implizieren, dass ein Anstieg der Treg Zellen für einen Rückgang der Erkrankung verantwortlich sein könnte. Die enge Korrelation zwischen der Abnahme der Apoptose und dem Anstieg der peripheren Treg Zellen in Assoziation mit dem Abfall der klinischen Krankheitsaktivität während einer erfolgreichen anti-TNFalpha Therapie lassen vermuten, dass diese Therapie

zur Reduktion der intestinalen Treg Zelloptose beiträgt. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, die einen Anstieg der Mucosa Treg Zellen in Verbindung mit einer erfolgreichen anti-TNFalpha Therapie bei Morbus Crohn Patienten zeigen konnte (Ricciardelli, I., *et al.*, 2008). Die molekularen Mechanismen der anti-TNFalpha-Wirkung sind in diesem Zusammenhang nur unzureichend bekannt. TNFalpha, dem eine zentrale Rolle bei aktiver CED zukommt, könnte durch Bindung an den TNF-Rezeptor-2, der von Treg Zellen konstitutiv exprimiert und durch TNF hochreguliert wird (Nadkarni, S., *et al.*, 2007; Valencia X., *et al.*, 2007), direkt Apoptose von Treg Zellen induzieren. Zusätzlich könnte die erhöhte Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen durch antigenpräsentierende Zellen die Suppressionsaktivität von Treg Zellen negativ beeinflussen (André, S., *et al.*, 2009; Betteli, E., *et al.*, 2008; Valencia, X., 2007). Weiterhin bestehen Hinweise darauf, dass anti-TNFalpha Antikörper die Funktion von Tregs positiv beeinflussen, indem sie die FoxP3 Expression induzieren, die TNF-Rezeptor-2 Expression reduzieren, das Überleben von Treg Zellen verbessern und zu einer *de novo* Produktion von dieser Zellen führen (Valencia, X., *et al.*, 2006; Nadkarni, S., *et al.*, 2007). Zusätzlich kann eine anti-TNFalpha Therapie zur Suppression von IL-6 und IL-1beta, welche Treg Zell-Funktion negativ beeinflussen, beitragen (Ulfgren, AK., *et al.*, 2000). Eine erfolgsversprechende Therapiestrategie zur Erhöhung der Treg Zellzahl könnten in diesem Zusammenhang auch neutralisierende monoklonale Antikörper gegen IL-6, IL-1beta oder CTLA-4 darstellen (Ulfgren, AK., *et al.*, 2000; Saadoun, D., *et al.*, 2008; Vallerskog T., *et al.*, 2007; Coquerelle C., *et al.*, 2009). Weiterhin könnten intrazelluläre Signalwege als therapeutisches Ziel zur Wiederherstellung einer suffizienten Treg Zellzahl oder Antwort dienen. In diesem Zusammenhang konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Inhibition des m-TOR Signalweges mittels Rapamycin eine direkte Steigerung der Expansion und des Überlebens von Treg Zellen hervorruft (Battaglia, M., *et al.*, 2005) und die Ausprägung einer experimentellen Colitis verringerte (Farkas, S., *et al.*, 2006). Ähnlich zeigten Versuche mit dem neuen Immunsuppressivum FTY720 eine Induktion von Treg Zellen und eine Verbesserung einer experimentellen Colitis (Zhou, PJ., *et al.*, 2009; Sehrawat, S., 2008; Daniel, C., *et al.*, 2007). Weitere Studien werden zeigen, inwieweit das Anreichern von Treg Zellen eine innovative Therapiestrategie zur Behandlung von CED-Patienten darstellt.

Zusammengefasst weisen unsere Daten daraufhin, dass eine erhöhte Apoptose der peripheren und lokalen Treg Zellen einen wichtigen Co-Faktor in der Pathogenese der CED darstellt. Eine anti-TNFalpha Therapie war mit einer verringerten Apoptoserate der peripheren Treg Zellen und konsekutivem Anstieg der Treg Zellzahl assoziiert. Da noch kein Konsens bezüglich der Dauer einer anti-TNFalpha Therapie besteht und bislang keine verlässlichen Aktivitätsmarker existieren, könnte der Nachweis der Treg Zellapoptose und / oder der Caspaseaktivierung im Serum zur Verlaufsbeurteilung der Krankheitsaktivität bzw. zum Monitoring des Therapieerfolges bei CED-Patienten herangezogen werden. Dabei könnten möglicherweise frühzeitig CED-Patienten identifiziert werden, welche nicht auf eine anti-TNFalpha Therapie ansprechen. Diese Patienten könnten somit früher alternativen Behandlungsstrategien zugeführt werden und wären nicht weiter mit den Risiken von Nebenwirkungen einer ineffizienten Therapieform konfrontiert. Weitere prospektive Studien sind erforderlich, um zu evaluieren ob sich der Nachweis der Treg-Apoptose bei CED-Patienten als prädiktiver Biomarker für das Therapieansprechen erweist.

## **5. Literatur**

- André, S., D.F. Tough, S. Lacroix-Desmazes, S.V. Kaveri, and J. Bayry. 2009. Surveillance of antigen-presenting cells by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in autoimmunity: immunopathogenesis and therapeutic implications. *Am. J. Pathol.* 174:1575-1587.
- Annacker, O., R. Pimenta-Araujo, O. Burlen-Defranoux, , T.C. Barbosa, A. Cumano, and A. Bandeira. 2001. CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J. Immunol.* 166:3008-3018.
- Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.* 184:387-396.
- Battaglia, M., A. Stabilini, and M.G. Roncarolo. 2005. Rapamycin selectively expands CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Blood.* 105:4743-4748.
- Belkaid, Y., C.A. Piccirillo, S. Mendez, E.M. Shevach, D.L. Sacks. 2002. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* 420:502-507.
- Best, W.R., J.M. Beckett, J.W. Singleton and F. Kern Jr. 1976. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology.* 70:439-444.
- Bettelli, E., T. Korn, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature.* 453:1051-1057.
- Bluestone, J.A., Q. Tang. 2005. How do CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control autoimmunity? *Curr. Opin. Immunol.* 17:638-642.
- Boirivant, M., R. Pica, R. DeMaria, R. Testi, F. Pallone, and W. Strober. 1996. Stimulated human lamina propria T cells manifest enhanced Fas-mediated apoptosis. *J. Clin. Invest.* 98:2616-2622.
- Bouillet, P., D. Metcalf, D.C. Huang, D.M. Tarlinton, T.W. Kay, F. Köntgen, J.M. Adams, A. Strasser. 1999. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science.* 286:1735-1738.

- Bouillet, P., J.F. Purton, D.I. Godfrey, L.C. Zhang, L. Coultas, H. Puthalakath, M. Pellegrini, S. Cory, J.M. Adams, A. Strasser. 2002. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature*. 415:922-926.
- Camps, M., T. Rückle, H. Ji, V. Ardisson, F. Rintelen, J. Shaw, C. Ferrandi, C. Chabert, C. Gillieron, B. Françon, et al. 2005. Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 11:936-943.
- Cohen, J.L., A. Trenado, D. Vasey, D. Klatzmann, and B.L. Salomon. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* 196:401-406.
- Coomes, J.L., N.J. Robinson, K.J. Maloy, H.H.Uhlig, F. Powrie. 2005. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol. Rev.* 204:184-194.
- Coquerelle, C., G. Oldenhove, V. Acolty, J. Denoeud, G. Vansanten, J.M. Verdebout, A. Mellor, J.A. Bluestone, and M. Moser. 2009. Anti-CTLA-4 treatment induces IL-10-producing ICOS<sup>+</sup> regulatory T cells displaying IDO-dependent anti-inflammatory properties in a mouse model of colitis. *Gut*. 58:1363-1373.
- Daniel, C., N.A. Sartory, N. Zahn, R. Schmidt, G. Geisslinger, H.H. Radeke, and J.M. Stein. 2007. FTY720 ameliorates oxazolone colitis in mice by directly affecting T helper type 2 functions. *Mol. Immunol.* 44:3305-3316.
- Davey, G.M., C. Kurts, J.F. Miller, P. Bouillet, A. Strasser, A.G. Brooks, F.R. Carbone, W.R. Heath. 2002. Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *J. Exp. Med.* 196:947-955.
- DiPaolo, R.J., D.D. Glass, K.E. Bijwaard, and E.M. Shevach. 2005. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells prevent the development of organ-specific autoimmune disease by inhibiting the differentiation of autoreactive effector T cells. *J. Immunol.* 175:7135-7142.
- Ehrenstein, M.R., J.G. Evans, A. Singh, S. Morre, G. Warnes, D.A. Isenberg, and C. Mauri. 2004. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J. Exp. Med.* 200:277-285.

- Elinav, E., T. Waks, and Z. Eshhar. 2008. Redirection of regulatory T cells with predetermined specificity for the treatment of experimental colitis in mice. *Gastroenterology*. 134:2014-2024.
- Fantini, M.C., C. Becker, I. Tubbe, A. Nikolaev, H.A. Lehr, P. Galle, and M.F. Neurath. 2006. Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut*. 55:671-680.
- Farkas, S., M. Hornung, C. Sattler, M. Guba, M. Steinbauer, M. Anthuber, H. Herfarth, H.J. Schlitt, and E.K. Geissler. 2006. Rapamycin decreases leukocyte migration in vivo and effectively reduces experimentally induced chronic colitis. *Int. J. Colorectal Dis*. 21:747-753.
- Faubion, W.A., Y.P. De Jong, A.A. Molina, H. Ji, K. Clarke, B. Wang, E. Mizoguchi, S.J. Simpson, A.K. Bhan, and C. Terhorst. 2004. Colitis is associated with thymic destruction attenuating CD4+25+ regulatory T cells in the periphery. *Gastroenterology*. 126:1759-1770.
- Fidler, H., F. Schnitzler, M. Ferrante, M. Noman, K. Katsanos, S. Segaeert, L. Henckaerts, G. Van Assche, S. Vermeire, and P. Rutgeerts. 2009. Long-term safety of infliximab for the treatment of inflammatory bowel disease: a single-centre cohort study. *Gut*. 58:501-508.
- Fischer, U., R.U. Jänicke, and K. Schulze-Osthoff. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell. Death. Differ*. 10:76-100.
- Fu, S., N. Zhang, A.C. Yopp, D. Chen, M. Mao, D. Chen, H. Zhang, Y. Ding, J.S. Bromberg. 2004. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am. J. Transplant*. 4:1614-1627.
- Goldstein, I., S. Ben-Horin, A. Koltakov, H. Chermoshnuk, V. Polevoy, Y. Berkun, N. Amariglio, and I. Bank. 2007. alpha1beta1 Integrin+ and regulatory Foxp3+ T cells constitute two functionally distinct human CD4+ T cell subsets oppositely modulated by TNFalpha blockade. *J. Immunol*. 178:201-210.

- Green, E.A., L. Gorelik, C.M. McGregor, E.H. Tran, and R.A. Flavell. 2003. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100:10878-10883.
- Haas, J., B. Fritzsching, P. Trübswetter, M. Korporal, L. Milkova, B. Fritz, D. Vobis, P.H. Krammer, E. Suri-Payer, and B. Wildemann. 2007. Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 179:1322-1330.
- Hernandez, J., S. Aung, W.L. Redmond, L.A. Sherman. 2001. Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *J. Exp. Med.* 194:707-717.
- Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 299:1057-1061.
- Hori, S., S. Sakaguchi. 2004. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect.* 6:745-751.
- Ivashkiv, L.B., and X. Hu. 2003. The JAK/STAT pathway in rheumatoid arthritis: pathogenic or protective? *Arthritis Rheum.* 48:2092-2096.
- Izcue, A., J.L. Coombes, and F. Powrie. 2009. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 27:313-338.
- Kelsen, J., J. Agnholt, H.J. Hoffmann, J.L. Rømer, C.L. Hvas, and J.F. Dahlerup. 2005. FoxP3(+)/CD4(+)/CD25(+) T cells with regulatory properties can be cultured from colonic mucosa of patients with Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 141:549-557.
- Lahl, K., C. Loddenkemper, C. Drouin, J. Freyer, J. Arnason, G. Eberl, A. Hamann, H. Wagner, J. Huehn, T. Sparwasser. 2007. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J. Exp. Med.* 204:57-63.
- Lange, C., H. Doster, K. Steinbach, H. Kalbacher, M. Scholl, A. Melms, and F. Bischof. 2009. Differential modulation of CNS-specific effector and regulatory T cells during tolerance induction by recombinant invariant chains in vivo. *Brain Behav. Immun.* 23:861-867.

- Lawson, C.A., A.K. Brown, V. Bejarano, S.H. Douglas, C.H. Burgoyne, A.S. Greenstein, A.W. Boylston, P. Emery, F. Ponchel, and J.D. Isaacs. 2006. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25high regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatology*. 45:1210-1217.
- Levings, M.K., S. Gregori, E. Tresoldi, S. Cazzaniga, C. Bonini, M.G. Roncarolo. 2005. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood*. 105):1162-1169.
- Lichtiger, S., D.H. Present, A. Kornbluth, I. Gelernt, J. Bauer, G. Galler, F. Michelassi, and S. Hanauer. 1994. Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *N. Engl. J. Med.* 330:1841-1845.
- Longhi, M.S., Y. Ma, D.P. Bogdanos, P. Cheeseman, G. Mieli-Vergani, and D. Vergani. 2004. Impairment of CD4(+)/CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J. Hepatol.* 2004. 41:31-37.
- Lorenz, H.M., M. Herrmann, T. Winkler, U. Gaip, J.R. Kalden. 2000. Role of apoptosis in autoimmunity. *Apoptosis*. 5:443-449.
- Luiten, R.M., J. Péne, H. Yssel, and H. Spits. 2003. Ectopic hTERT expression extends the life span of human CD4+ helper and regulatory T-cell clones and confers resistance to oxidative stress-induced apoptosis. *Blood*. 101:4512-4519.
- Makita, S., T. Kanai, Y. Nemoto, T. Totsuka, R. Okamoto, K. Tsuchiya, M. Yamamoto, H. Kiyono, and M. Watanabe. 2007. Intestinal lamina propria retaining CD4+CD25+ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. *J. Immunol.* 178:4937-4946.
- Makita, S., T. Kanai, S. Oshima, K. Uraushihara, T. Totsuka, T. Sawada, T. Nakamura, K. Koganei, T. Fukushima, and M. Watanabe. 2004. CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J. Immunol.* 173:3119-3130.
- Maloy, K.J., L. Salaun, R. Cahill, G. Dougan, N.J. Saunders, and F. Powrie. 2003. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J. Exp. Med.* 197:111-119.

- Mantel, P.Y., N. Ouaked, B. Rückert, C. Karagiannidis, R. Welz, K. Blaser, C.B. Schmidt-Weber. 2006. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J. Immunol.* 176:3593-3602.
- Matsuzaki, Y, K. Nakayama , K. Nakayama, T. Tomita, M. Isoda, D.Y. Loh, H. Nakauchi. 1997. Role of bcl-2 in the development of lymphoid cells from the hematopoietic stem cell. *Blood.* 89:853-862.
- Maul, J., C. Loddenkemper, P. Mundt, E. Berg, T. Giese, A. Stallmach, M. Zeitz, and R. Duchmann. 2005. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 128:1868-1878.
- McGuckin, M.A., R. Eri, L.A. Simms, T.H. Florin, and G. Radford-Smith. 2009. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 15:100-113.
- Mérino, D., P. Bouillet P. 2009. The Bcl-2 family in autoimmune and degenerative disorders. *Apoptosis.* 14:570-583.
- Mizoguchi, A., and E. Mizoguchi. 2008. Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models. *J. Gastroenterol.* 43:1-17.
- Mohamood, A.S., C.J. Trujillo, D. Zheng, C. Jie, F.M. Murillo, J.P. Schneck, and A.R. Hamad. 2006. Gld mutation of Fas ligand increases the frequency and up-regulates cell survival genes in CD25+CD4+ TR cells. *Int. Immunol.* 18:1265-1277.
- Mottet, C., H.H. Uhligg, and F. Powrie. 2003. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 170:3939-3943.
- Nadkarni, S., C. Mauri, and M.R. Ehrenstein. 2007. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J. Exp. Med.* 204:33-39.
- Nakamura, K., A. Kitani, W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* 194:629-644.
- Packey, C.D., and R.B. Sartor. 2008. Interplay of commensal and pathogenic bacteria, genetic mutations, and immunoregulatory defects in the pathogenesis of iflammatory bowel diseases. *J. Intern. Med.* 263:597-606.

- Powrie, F. 2004. Immune regulation in the intestine: a balancing act between effector and regulatory T cell responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1029:132-141.
- Pronio, A., C. Montesani, C. Butteroni, S. Vecchione, G. Mumolo, A. Vestri, D. Vitolo, and M. Boirivant. 2008. Probiotic administration in patients with ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis is associated with expansion of mucosal regulatory cells. *Inflamm. Bowel Dis.* 14:662-668.
- Reardon, C., A. Wang, and D.M. McKay. 2008. Transient local depletion of Foxp3+ regulatory T cells during recovery from colitis via Fas/Fas ligand-induced death. *J. Immunol.* 180:8316-8326.
- Redmond W.L., C.H. Wei, H.T. Kruwel, L.A. Sherman. 2008. The apoptotic pathway contributing to the deletion of naive CD8 T cells during the induction of peripheral tolerance to a cross-presented self-antigen. *J. Immunol.* 180:5275-5282.
- Ricciardelli, I., K.J. Lindley, M. Londei, and S. Quarantino. 2008. Anti tumour necrosis-alpha therapy increases the number of FOXP3 regulatory T cells in children affected by Crohn's disease. *Immunology.* 125:178-183.
- Rutgeerts, P., S. Vermeire, and G. Van Assche. 2009 Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 136:1182-1197.
- Saadoun, D., M. Rosenzweig, D. Landau, J.C. Piette, D. Klatzmann, and P. Cacoub. 2008. Restoration of peripheral immune homeostasis after rituximab in mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood.* 111:5334-5341.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155:1151-1164.
- Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi, T. Nomura. 2006. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 212:8-27.
- Saruta, M., Q.T. Yu, P.R. Fleshner, P.Y. Mantel, C.B. Schmidt-Weber, A.H. Banham, and K.A. Papadakis. 2007. Characterization of FoxP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clin. Immunol.* 125:281-290.

- Schnitzler, F., H. Fidder, M. Ferrante, M. Noman, I. Arijs, G. van Assche, I. Hoffman, K. van Steen, S. Vermeire, and P. Rutgeerts. 2009. Long term outcome of treatment with infliximab in 614 Crohn's disease Patients: results from a single centre cohort. *Gut* 58:492-500.
- Schubert L.A., E. Jeffery, Y. Zhang, F. Ramsdell, S.F. Ziegler. 2004. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J. Biol. Chem.* 276:37672-37679.
- Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg, and M.E. Peter. 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 254:439-459.
- Sehrawat, S., and B.T. Rouse. 2008. Anti-inflammatory effects of FTY720 against viral-induced immunopathology: role of drug-induced conversion of T cells to become Foxp3+ regulators. *J. Immunol.* 180:7636-7647.
- Sturm, A., A.Z. Leite, S. Danese, K.A. Krivacic, G.A. West, S. Mohr, J.W. Jacobberger, and C. Fiocchi. 2004. Divergent cell cycle kinetics underlie the distinct functional capacity of mucosal T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut.* 53:1624-31.
- Sturm, A., S. Mohr, and C. Fiocchi. 2002. Critical role of caspases in the regulation of apoptosis and proliferation of mucosal T cells. *Gastroenterology.* 122:1334-1345.
- Suri-Payer, E., A.Z. Amar, A.M. Thornton, and E.M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 160:1212-1218.
- Taams, L.S., J. Smith, M.H. Rustin, M. Salmon, L.W. Poulter, and A.N. Akbar. 2001. Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur. J. Immunol.* 31:1122-1131.
- Takahashi, M., K. Nakamura, K. Honda, Y. Kitamura, T. Mizutani, Y. Araki, T. Kabemura, Y. Chijiwa, N. Harada, and H. Nawata. 2006. An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 51:677-686.

- Tao, R., E.F. de Zoeten, E. Ozkaynak, C. Chen, L. Wang, P.M. Porrett, B. Li, L.A. Turka, E.N. Olson, M.I. Greene, et al. 2007. Deacytelase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nat. Med.* 13:1299-1307.
- Torres, M.I., and A. Rios. 2008. Current view of the immunopathogenesis in inflammatory bowel disease and its implications for therapy. *World J. Gastroenterol.* 14:1972-1980.
- Toubi, E., A. Kessel, Z. Mahmudov, K. Hallas, M. Rozenbaum, and I. Rosner. 2005. Increased spontaneous apoptosis of CD4+CD25+ T cells in patients with active rheumatoid arthritis is reduced by infliximab. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 442:157-181.
- Ulfgren, A.K., L. Gröndal, S. Lindblad, M. Khademi, O. Johnell, L. Klareskog, and U. Andersson. 2000. Interindividual and intra-articular variation of proinflammatory cytokines in patients with rheumatoid arthritis: potential implications for treatment. *Ann. Rheum. Dis.* 59:439-447.
- Vaculova, A., B. Zhivotovsky. 2008. Caspases: determination of their activities in apoptotic cells. *Methods Enzymol.* 442:157-181.
- Valencia, X., G. Stephens, R. Goldbach-Mansky, M. Wilson, E.M. Shevach, and P.E. Lipsky. 2006. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood.* 108:253-261.
- Valencia, X., C. Yarboro, G. Illei, and P.E. Lipsky. 2007. Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 178:2579-2588.
- Vallerskog, T., I. Gunnarsson, M. Widhe, A. Risselada, L. Klareskog, R. van Vollenhoven, V. Malmström, and C. Trollmo. 2007. Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with SLE. *Clin. Immunol.* 122:62-74
- Veis, D.J., C.L. Sentman, E.A. Bach, S.J. Korsmeyer. 1993. Expression of the Bcl-2 protein in murine and human thymocytes and in peripheral T lymphocytes. *J. Immunol.* 151:2546-2554.

- Veltkamp, C., R. Ruhwald, T. Giesem, F. Autschbach, I. Kadem, R. Veltkamp, R.B. Sartor, and W. Stremmel. 2006. CD4+CD25+ cell depletion from the normal CD4+ T cell pool prevents tolerance toward the intestinal flora and leads to chronic colitis in immunodeficient mice. *Inflamm. Bowel Dis.* 12:437-446.
- Veltkamp, C., R. Ruhwald, R. Veltkamp, T. Giese, and W. Stremmel. 2007. Regulatory CD4+ CD25+ T cells prevent thymic dysfunction in experimental chronic colitis. *Scand. J. Immunol.* 66:636-644.
- Veltkamp, C., R.B. Sartor, T. Giese, F. Autschbach, I. Kaden, R. Veltkamp, D. Rost, B. Kallinowski, and W. Stremmel. 2005. Regulatory CD4+CD25+ cells reverse imbalances in the T cell pool of bone marrow transplanted TGEpsilon26 mice leading to the prevention of colitis. *Gut.* 54:207-214.
- Veltkamp, C., S.L. Tonkonogy, Y.P. De Jong, C. Albright, W.B. Grenther, E. Balish, C. Terhorst, and R.B. Sartor. 2001. Continuous stimulation by normal luminal bacteria is essential for the development and perpetuation of colitis in Tg(epsilon26) mice. *Gastroenterology.* 120:900-913.
- Wang, L., R. Tao, and W.W. Hancock. 2009. Using histone deacetylase inhibitors to enhance Foxp3(+) regulatory T-cell function and induce allograft tolerance. *Immunol. Cell Biol.* 87:195-202.
- Wehkamp, J., M. Koslowski, G. Wang, and E.F. Stange. 2008. Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease. *Mucosal Immunol.* 1: S67-S74.
- Wu, Y., M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A.D. Lapan, J.C. Stroud, D.L. Bates, L. Guo, A. Han, A. S.F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen, A. Rao. 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell.* 126:375-387.
- Yu, Q.T., M. Saruta, A. Avanesyan, P.R. Fleshner, A.H. Banham, and K.A. Papadakis. 2007. Expression and functional characterization of FoxP3+CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 13:191-199.
- Zhivotovsky, B., A. Samali, A. Gahm, and S. Orrenius. 1999. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ.* 6:644-651.

Zhou, P.J., H. Wang, G.H. Shi, X.H. Wang, and Z.J. Shen, D. Xu. 2009. Immunomodulatory drug FTY720 induces regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 157:40-47.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

- **Name:** Matthias Anstätt
- **Geburtstag- und ort:** 02.06.1975 in Hamburg
- **Familienstand:** ledig
- **Staatsangehörigkeit:** deutsch

## Kurzprofil

---

- **Doktorand seit Dezember 2004**
- **Erfahrungen in klinischen Studien und immunologischen Techniken**
- **Forschungstätigkeit in der Gastroenterologie und in der Botanik**

## Arbeitsverhältnisse

---

- **12/2004 - heute** **Doktorand**  
„Medizinische Hochschule Hannover“, Hannover
  - Betreuung klinischer Studien
  - Apoptose-Forschung inkl. immunologischer Fragestellungen
  - Anleitung von TAs und Doktoranden
- **06/2004 - 11/2004** **Praktikum**  
Evotec neurosciences, Hamburg
  - Alzheimer-Forschung im Bereich Proteinbiochemie
- **04/2003 - 03/2004** **Telefonagent**
  - Outbound
- **07/2000 - 12/2002** **Studentische Hilfskraft**  
„Institut für Angewandte Botanik der Universität Hamburg“, Hamburg
  - mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten

### Studiengänge

---

- **10/1997 - 11/2002**  
**Studiengang: Biologie**  
„Universität Hamburg“, Hamburg
  - Schwerpunkte: Genetik/Molekularbiologie, Biochemie und Mikrobiologie
  - November 2002: Zuerkennung des Grades Diplom-Biologin
  - Gesamtnote: „sehr gut“
  - Thema: „Herstellung eines Plasmids zur Deletion des Gens der Uridindiphosphat-Glucose:Sterol-beta-D-Glucosyltransferase (SGT) in *Dictyostelium discoideum* und Etablierung von Verfahren zur Analyse von Deletionsmutanten“

### Wehrdienst

---

- **11/1996 – 08/1997** Wehrdienst

### Schulbildung

---

- **10/1995 – 07/1996** Grundausbildungslehrgang für kaufmännisch-verwaltende Berufe
- **1986 - 1995** Gymnasium, Hamburg  
Abschluss Abitur
- **1982 - 1986** Grundschule, Hamburg

### Fortbildungen

---

- Tierexperimentelles Arbeiten
- Fortbildung nach §15 Abs. 2 Satz 1 Nr. 3 GenTSV

### EDV Kenntnisse

---

- Microsoft Office
- Corel Paintshop Pro
- Adobe Photoshop
- SPSS
- GraphPad-Prism
- Div. Gerätesoftware

### Sprachen

---

- **Englisch** Fließend in Wort und Schrift

Hannover, 16 März 2010

## **Publikationen**

Anstaett, M., X. Volkmann, J. Hadem, P. Stiefel, M.J. Bahr, F. Lehner, M.P. Manns, K. Schulze-Osthoff, H. Bantel. 2008. Caspase activation is associated with spontaneous recovery from acute liver failure. *Hepatology*. 47:1624-1633.

Brandt, D., X. Volkmann, M. Anstatt, F. Länger, M.P. Manns, K. Schulze-Osthoff, H. Bantel. 2010. Serum biomarkers of cell death for monitoring therapy response of gastrointestinal carcinomas. *Eur. J. Cancer*. [Epub ahead of print]

## **Danksagung**

Ich danke Frau Prof Dr. Bantel für 5 Jahre Geduld und die Möglichkeit in Ihrem Labor meine Arbeit durchzuführen.

Dr. Hardtke-Wolenski für unzählige Gespräche und gesunden Gedankenaustausch.

Dr. Fatih Noyan dafür, dass er er ist.

Sarah Möller für die Unterstützung bei diesem Projekt.

Meiner Freundin für den Beistand, die Liebe und den Druck, ohne den ich nicht soweit gekommen wäre.

Und schlussendlich meiner Mutter, denn ohne sie wäre alles viel schwerer gewesen.

## **Erklärung zur Dissertation**

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation „Die Rolle der Apoptose bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen“ selbständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, 16.03.2010

---

Matthias Anstatt