

Aus der Abteilung Klinische Chemie
(Dr.med. Lutz Binder)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Neue Biomarker zur Überwachung der zellulären Immunität
chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Sebastian Weigand
aus
Köln

Göttingen 2012

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. K. Kroemer
I. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Oellerich
II. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. Oppermann
III. Berichterstatterin/in:	Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp
Tag der mündlichen Prüfung:	24. Juni 2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Immunsystem.....	1
1.1.1. Die T-Lymphozyten.....	3
1.1.2. Die Selbsttoleranz.....	4
1.1.3. CD4-positive T-Lymphozyten	5
1.1.3.1. TH1- und TH2-Zellen.....	5
1.1.3.2. TH17-Zellen	6
1.1.3.3. Regulatorische T-Zellen	6
1.1.3.3.1. Funktionen regulatorischer T-Zellen	9
1.2. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	11
1.2.1. Ursachen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen.....	13
1.2.2. Therapie von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.....	15
1.3. Nutzen immunologischer Biomarker bei CED.....	16
1.3.1. ATP-Immune-Cell-Function-Assay	17
1.3.2. Quantifizierung Regulatorischer T-Zellen.....	17
1.4. Zusammenfassung der Ziele der Arbeit.....	18
2. Material und Methoden	20
2.1. Biologisches Material	20
2.1.1. Antikörper	20
2.2. Chemikalien.....	20
2.3. Gebrauchswaren	20
2.4. Geräte und Software	20
2.5. Kits	21
2.6. Puffer und Lösungen	22
2.7. Studiendesign	22
2.8. Patientenfragebögen und Krankheitsaktivitätsindices	23
2.9. Klinisch-chemische Parameter	24
2.9.1. C-reaktives Protein.....	25
2.9.2. Albumin	25
2.10. Maschinelles Differential-Blutbild.....	25
2.11. Cylex®-ImmuKnow®-Assay	26
2.11.1. Hintergrundinformation	26
2.11.2. Durchführung.....	27
2.12. PBMC-Isolierung	28

IV

2.12.1.	Hintergrund	28
2.12.2.	Durchführung.....	29
2.13.	Durchflusszytometrie	30
2.13.1.	Durchflusszytometrische Messung von regulatorischen T-Zellen	32
2.13.2.	Gating-Strategie	33
2.14.	FOXP3-DNA-Methylierungs-Analyse.....	35
2.14.1.	Genomische DNA-Isolierung.....	35
2.14.2.	DNA-Denaturierung und Bisulfit-Reaktion.....	36
2.14.3.	Fluoreszenz-basierte quantitative Real-time PCR.....	36
3.	Ergebnisse	38
3.1.	Auswertung der Patientendaten	38
3.2.	Auswertung der Krankheitsaktivitätsindices.....	39
3.2.1.	<i>Crohn's Disease Activity Index</i> der Morbus-Crohn-Patienten	39
3.2.2.	<i>Harvey-Bradshaw-Index</i> der Morbus-Crohn-Patienten	40
3.2.3.	<i>Simple Clinical Colitis Activity Index</i>	41
3.2.4.	Vergleich des CDAI mit dem HBI	42
3.2.5.	Vergleich der Krankheitsaktivitätsindices mit den laborchemischen Parametern.....	43
3.3.	Auswertung der intrazellulären ATP-Konzentrationen in CD4 ⁺ -T-Zellen.....	43
3.3.1.	Korrelation der ATP-Konzentrationen mit den Krankheitsaktivitätsindices	45
3.3.2.	Korrelation der ATP-Konzentrationen mit den CRP- und Albumin-Konzentrationen.....	48
3.3.3.	Korrelation der intrazellulären ATP-Konzentrationen mit einer Glukokortikoid-Therapie	49
3.3.4.	Zusammenhang zwischen den ATP-Konzentrationen und einer Infliximab-Therapie	50
3.4.	Quantifizierung regulatorischer T-Zellen mittels der FACS-Analytik	51
3.4.1.	Korrelation der Anzahl regulatorischer T-Zellen mit den Krankheitsaktivitätsindices	53
3.4.2.	Einfluss von Medikamenten auf die Anzahl regulatorischer T-Zellen.....	56
3.5.	Quantifizierung regulatorischer T-Zellen mithilfe eines FoxP3-spezifischen DNA-Methylierungsassays.....	57
3.5.1.	Vergleich der FoxP3-Werte aus dem DNA-Methylierungs-Assay mit den Krankheitsaktivitätsindices	58
3.5.2.	Zusammenhang zwischen der Anzahl regulatorischer T-Zellen aus dem DNA-Methylierungs-Assay und der Prednisolon-Therapie.....	60
3.6.	Vergleich der Anzahl regulatorischer T-Zellen aus der FACS-Analytik mit der aus dem DNA-Methylierungsassay.....	60

4. Diskussion	62
4.1. Die intrazelluläre ATP-Konzentration von CD4 ⁺ -T-Zellen als immunologischer Marker der Krankheitsaktivität chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen	62
4.1.1. Die Abhängigkeit der Immunantwort von CD4 ⁺ -Zellen von Glukokortikoiden und Infliximab	65
4.2. Die Anzahl regulatorischer T-Lymphozyten als immunologischer Marker der Krankheitsaktivität von CED-Patienten	66
4.2.1. Die Quantifizierung regulatorischer T-Lymphozyten mittels der Durchflusszytometrie	66
4.2.2. Die Quantifizierung regulatorischer T-Lymphozyten mittels eines DNA-Methylierungsassays	71
4.2.3. Vergleich der beiden Methoden zur Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen	72
5. Zusammenfassung	75
6. Anhang	78
6.1. Patientenaufklärung	78
6.2. Fragebogen (Morbus Crohn)	79
6.3. Fragebogen (Colitis ulcerosa)	80
6.4. Einverständniserklärung	81
6.5. Primersequenzen	82
7. Literaturverzeichnis	83

Abkürzungsverzeichnis

ATP.....	Adenosintriphosphat
BCG	Bromkresolgrün
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CDAI.....	Crohn's Disease Activity Index
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP.....	C-reaktives Protein
CU	Colitis ulcerosa
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
FACS.....	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FOXP3	Forkhead-Box-Protein 3
FRET.....	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
FSC.....	Forward Scatter
g	Gravidität, Gramm
Hb	Hämoglobin
HBI	Harvey-Bradshaw-Index
Hkt	Hämatokrit
iATP.....	Intrazelluläres Adenosintriphosphat
ICAM-1.....	Intercellular-adhesion-molecule-1
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LFA-1.....	Lymphocyte-function-associated-antigen-1
MC	Morbus Crohn
MCH.....	Mittleres Korpuskuläres Hämoglobin
MCHC.....	Mittlere Korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration
MCV.....	Mittleres Erythrozytenvolumen
MHC.....	Major Histocompatibility Complex
µl	Mikroliter
ml.....	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
ng.....	Nanogramm
nm.....	Nanometer
PAMPs	Pathogen-associated molecular Patterns
PCR.....	Polymerase-Kettenreaktion
PHA	Phytohämagglutinin
PRR.....	Pattern-Recognition Receptor
RLU	Relative Light Unit
SCCAI.....	Simple Clinical Colitis Activity Index
SD.....	Standardabweichung
SSC	Sidwards Scatter
TCR.....	T-Zell-Rezeptor
T _H	T-Helferzelle
TLR.....	Toll-like Rezeptor
TNF.....	Tumornekrosefaktor

VII

TPMT..... *Thiopurin-S-Methyltransferase*
T_{regs} *Regulatorische T-Zellen*
TSDR..... *Treg-spezifische Demethylierungsregion*

1. Einleitung

Evolutionsbedingt entstand in der Phylogenese der Lebewesen bereits früh eine Immunabwehr, um zwischen körpereigenen und potentiell gefährlichen, körperfremden Substanzen zu unterscheiden. Zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase muss dabei gewährleistet sein, dass Bakterien, Pilze, Parasiten, aber auch Viren und weitere Fremdkörper wirkungsvoll neutralisiert, aber indes die körpereigenen Gewebe geschont werden. In Anbetracht der Tatsache, dass die Autoimmunerkrankungen bei Frauen im jungen und mittleren Alter in den USA zu den häufigsten Todesursachen zählen, scheint der menschliche Körper diesem Anspruch zunehmend nicht mehr gerecht werden zu können (Cooper und Stroehla 2003). Auch die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen reihen sich in die Liste der Krankheiten ein, bei denen eine fehlgeleitete, beziehungsweise überschießende Immunabwehr zu einer in Schüben verlaufenden Krankheitssymptomatik führt. Eine Kausaltherapie ist bei den Autoimmunerkrankungen derzeit nicht möglich und somit besteht die Behandlung meist aus symptomatischer Therapie und Immunsuppression. Im Rahmen der Rezidivprophylaxe, aber auch der Initial- und Verlaufsdiagnostik der Immunopathien könnten immunologische Biomarker einen wertvollen Beitrag leisten (vgl. 1.3, Seite 16). Diese Arbeit widmet sich der Untersuchung der Eignung innovativer Biomarker als Surrogatparameter für die Krankheitsaktivität von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.

1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus einem angeborenen, unspezifischen und einem erworbenen, spezifischen Teil der Immunabwehr. Das unspezifische Immunsystem agiert zum einen mithilfe von Makrophagen beziehungsweise Monozyten und Granulozyten, welche über Phagozytose Fremdeiweiße und Mikroorganismen aufnehmen und verdauen. Zum anderen werden Fremdkörper mittels der humoralen Abwehr eliminiert. Hierbei wird dem Komplementsystem eine Hauptaufgabe zugesprochen. Es besteht aus verschiedenen im Blut zirkulierenden Proteinen, welche Krankheitserreger für die Phagozytose opsonieren oder durch Porenbildung lysieren. Einige der Proteine des Komplementsystems dienen zudem als Chemokine. Diese locken weitere Phagozyten an und führen zu einer Entzündungsreaktion

des befallenen Gewebes. Die Erkennung körperfremder Strukturen geschieht einerseits durch Komplementproteine wie dem C3b, welches sich unspezifisch an Fremdkörper bindet, und wird andererseits mithilfe verschiedener Rezeptoren vollzogen. So erkennen spezifische Pathogen-erkennende Rezeptoren (PRRs) charakteristische Merkmale von Pathogenen, sogenannte PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Unter die PRRs fallen die sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLR), welche sich auf einigen Zellen des angeborenen Immunsystems befinden. Sie erkennen bestimmte molekulare Strukturen von Prokaryonten und sind somit besonders an der Identifizierung von Bakterien beteiligt (Rock et al. 1998; Takeda und Akira 2005).

Bereits viral oder bakteriell infizierte Zellen können mithilfe von natürlichen Killerzellen eliminiert werden, ohne dass diese vorher mit dem Erreger in Kontakt getreten sind. Die natürliche Killerzelle erkennt eine abnorme Zelle an ihrer verminderten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen. Dieses Prinzip wird „missing-self“ genannt und wurde 1985 von Klas Karre postuliert (Karre 1991; Ljunggren und Karre 1990). So können vor allem virusinfizierte Zellen, aber auch maligne transformierte Zellen durch die natürlichen Killerzellen in die Apoptose getrieben oder durch ihre lytischen Enzyme neutralisiert werden.

Zum unspezifischen Immunsystem zählen des Weiteren die physikalischen und biochemischen Barriersysteme, wie Haut, Schleimhäute, aber auch Magensäure, Schleim, Schweiß, Tränen und antimikrobielle Enzyme wie das Lysozym. Das unspezifische Immunsystem ist allein jedoch nicht in der Lage, eine langanhaltende Immunität zu gewährleisten und wird deshalb durch das, mit ihm interagierende, adaptive Immunsystem unterstützt. Dieses spezifische Immunsystem ist fähig, sich dem jeweiligen Krankheitserreger anzupassen und ihn gezielt zu bekämpfen. Es besteht vor allem aus zwei Zellpopulationen: den B-Lymphozyten und den, in dieser Arbeit vorwiegend untersuchten, T-Lymphozyten.

Die B-Lymphozyten besitzen die Fähigkeit, sich in Plasmazellen zu differenzieren und spezifische Antikörper gegen die Epitope der Antigene von Fremdkörpern bzw. Krankheitserregern zu produzieren. Für diesen Schritt ist jedoch zum einen ein zufälliger Kontakt des B-Zell-Rezeptors zum Antigen nötig und zum anderen eine Aktivierung des B-Lymphozyten durch eine T_H2-Zelle (siehe 1.1.3.1, Seite 5). Für den Kontakt zwischen B-Lymphozyt und T_H2-Zelle wird das gebundene Antigen inkorporiert, zerlegt und auf einem MHC-Klasse-2-Rezeptor präsentiert. Die T_H2-Zelle bindet mit ihrem T-Zellrezeptor das präsentierte Antigen der B-Zelle und aktiviert diese mithilfe von verschiedenen Interleukinen

und durch den Kontakt von weiteren Rezeptoren und Liganden (z.B. CD40). Der B-Lymphozyt - jetzt auch als Plasmazelle bezeichnet - wird zur Proliferation und Bildung von Antikörpern angeregt, wobei das Interleukinmuster der T_H2-Zelle über die zu bildende Antikörperklasse wie IgA, IgE oder IgG entscheidet (LeBien und Tedder 2008; Mesquita Junior et al. 2010). Die sezernierten Antikörper, auch als Immunglobuline bezeichnet, binden wiederum an Epitope des Antigens und können dadurch verschiedene Aufgaben bei einer weiteren Immunreaktion ausführen. Zum einen können sie über die Blockade des Antigens dieses neutralisieren oder für die Phagozyten opsonieren. Zum anderen kann ein Antigen-gebundener Antikörper das Komplementsystem oder die natürlichen Killerzellen aktivieren. Des Weiteren kann die Bindung der Antikörper an Antigene zu einer Agglutination der Antigene führen, da ein Antikörper mehrere Antigenbindungsstellen besitzt (LeBien und Tedder 2008; Mesquita Junior et al. 2010).

1.1.1. Die T-Lymphozyten

Ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung einer Subpopulation von T-Lymphozyten, den regulatorischen T-Zellen. Die T-Lymphozyten entstehen, wie die B-Lymphozyten, aus den lymphatischen Stammzellen des Knochenmarks, verlassen dieses jedoch in einem frühen Stadium und reifen im Thymus weiter heran. Durch somatische Rekombination verschiedener Gensegmente bei der Proliferation der T-Zellvorläufer im Thymusstroma entstehen verschiedene T-Zellrezeptoren. Ein T-Zellrezeptor setzt sich aus einer α - und β -Glykoproteinkette zusammen. Ähnlich wie bei den B-Lymphozyten im Knochenmark, kommt es auch bei den T-Zellen zu einer Selektion im Thymus. Jedoch findet dabei als erstes eine positive Selektion statt. Nur diejenigen T-Lymphozyten, welche an MHC-Klasse-1- oder an MHC-Klasse-2-Proteine binden, reifen weiter heran. Im Anschluss sorgen dendritische Zellen und Makrophagen des Thymus für eine negative Selektion, indem alle T-Zellen, welche an körpereigene Proteine binden, durch Apoptose eliminiert werden. Die überlebenden T-Zellen stellen nun die reifen naiven T-Lymphozyten dar und exponieren an ihrer Oberfläche CD3-Rezeptoren, zur Bildung des TCR-CD3-Komplexes und CD4-Rezeptoren zur Bindung an MHC-Klasse-2-Proteine oder CD8-Rezeptoren zur Bindung an MHC-Klasse-1-Proteine.

Zur Aktivierung der naiven T-Lymphozyten binden ihre T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplexe an Antigene, welche auf antigenpräsentierenden Zellen, z.B. Makrophagen, mithilfe von MHC-Klasse-2-Proteinen präsentiert werden. Sogenannte Adhäsionsmoleküle stabilisieren die Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor und Antigen. Zum Beispiel bindet das *Lymphocyte-function-associated-antigen-1* (LFA-1) der T-Lymphozyten an das *Intercellular-adhesion-molecule-1* (ICAM-1) der antigenpräsentierenden Zelle (Rothlein et al. 1986; Yang et al. 2005). Zur vollständigen Aktivierung der T-Zelle werden außerdem kostimulatorische Signale benötigt. Es interagieren verschiedene Rezeptoren auf der T-Zelle mit Liganden auf der antigenpräsentierenden Zelle. So ist die Interaktion zwischen dem Oberflächenrezeptor CD28 der T-Zellen und den Kostimulatoren CD80 und CD86, auch als B7-1 und B7-2 bezeichnet, zwingend notwendig für die Aktivierung der T-Lymphozyten (Greenfield et al. 1998). Die so aktivierten T-Zellen synthetisieren anschließend Interleukin 2 und exprimieren gleichzeitig IL-2-Rezeptoren. Somit stimulieren sie ihre eigene Proliferation.

Nach der Aktivierung der naiven CD4-positiven T-Zellen entstehen aus ihnen, in Abhängigkeit von dem zuvor kontaktierten Antigen und dem jeweiligen Zytokinmilieu, T_H1-Zellen, T_H2-Zellen, T_H17-Zellen oder induzierbare regulatorische T-Zellen (iT_{regs}) (Mesquita Junior et al. 2010; Zhu und Paul 2008).

Aus den CD8-positiven Zellen entstehen nach Aktivierung sogenannte zytotoxische T-Zellen. Die zytotoxischen T-Zellen vermitteln einen Teil der zellulären Immunantwort und sind insbesondere für die Einleitung der Apoptose virusinfizierter Zellen, mithilfe der Ausschüttung von Granzymen, Perforinen und der Induktion von Caspase-Kaskaden, zuständig. (Bradley 2003; Hoves et al. 2010; Parkin und Cohen 2001; Stutman 1978)

1.1.2. Die Selbsttoleranz

Zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase werden Regulationsmechanismen benötigt, welche eine Reaktion des Immunsystems gegen körpereigene Gewebe verhindern.

Einen dieser Regulationsmechanismen stellt die sogenannte „zentrale Toleranz“ dar, bei der eine Selektion autoreaktiver B-Lymphozyten im Knochenmark und autoreaktiver T-Lymphozyten im Thymus stattfindet. Indes sorgt eine „periphere Toleranz“ für die Unterdrückung der Immunreaktion autoreaktiver Zellen, die trotz der „zentralen Toleranz“ in die Zirkulation gelangt sind.

Die „periphere Toleranz“ besteht hauptsächlich aus drei Regulationsmechanismen. Der erste Mechanismus beruht auf der Anergie einer T-Zelle, der ein Antigen am T-Zell-Rezeptor präsentiert wird, welche aber gleichzeitig nicht kostimuliert wird. Durch diese unvollständige Aktivierung der T-Zelle lebt diese zwar weiter, ist aber nicht mehr aktivierbar und eine Immunantwort auf das präsentierte Antigen bleibt aus (Choi und Schwartz 2007; Daniel et al. 2009; Schwartz 2003). Der zweite Mechanismus beruht auf der Deletion der aktivierten T-Zelle (per Apoptose) bei erneuter Antigen-Präsentation in hoher Konzentration oder erneuter Aktivierung der bereits aktivierten T-Zelle (Daniel et al. 2009).

Den dritten und für diese Arbeit wichtigsten Regulationsmechanismus stellt die Suppression der T-Zellen durch die regulatorischen T-Zellen dar (vgl. 1.1.3.3.1, Seite 9).

1.1.3. CD4-positive T-Lymphozyten

1.1.3.1. T_H1- und T_H2-Zellen

Es existieren mindestens vier verschiedene Subtypen CD4-exprimierender T-Zellen. Die T-Helferzellen 1, 2 und 17 sowie die regulatorischen T-Zellen.

Die Unterteilung der T-Helferzellen 1 und 2 erfolgt anhand ihrer Zytokin-Muster (Mosmann et al. 1986). Die **T_H1-Zellen** sezernieren vorwiegend die Signalstoffe IFN- γ , IL-2 und TNF- α und beteiligen sich damit an der zellulären Immunantwort, während die **T_H2-Zellen** durch die Sekretion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 für die humorale Immunantwort zuständig sind (Mosmann et al. 1986). Die zelluläre Immunantwort besteht aus verschiedenen Zellen, welche unterschiedliche Aufgaben in der Bekämpfung von Krankheitserregern wahrnehmen. Gesteuert durch die Signalstoffe der T_H1-Zellen gelangen zum Beispiel Granulozyten an den Ort einer Entzündung, um dort mithilfe ihrer Granula Krankheitserreger unschädlich zu machen. Des Weiteren werden Makrophagen und dendritische Zellen durch die Signalstoffe zur Aufnahme und Verdauung von Erregern stimuliert. Die T_H1-Zellen dirigieren somit die einzelnen zellulären Bestandteile des Immunsystems zur Ausführung ihrer Aufgaben. Die T_H2-Zellen hingegen regen mithilfe ihrer Zytokine besonders die B-Lymphozyten zur Bildung und Ausschüttung von Erregerspezifischen Antikörpern an (Zhu und Paul 2008).

1.1.3.2. T_H17-Zellen

Die erst vor wenigen Jahren entdeckten T_H17-Zellen sezernieren vorwiegend IL-17, IL-21 und diverse weitere meist proinflammatorische Zytokine. Sie spielen unter anderem eine Rolle in der Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze (Weaver et al. 2006) und sind am Recruitment, an der Aktivierung und an der Migration von neutrophilen Granulozyten beteiligt. Bei der Umwandlung einer naiven CD4⁺-Zelle in eine IL-17-sezernierende Zelle stellt vermutlich IL-6 ein notwendiges Signal dar (Harrington et al. 2005). Hohe Dosen des Zytokins TGF-β1 hingegen wirken hemmend auf die T_H17-Zell-Proliferation und fördern andererseits die Proliferation von regulatorischen T-Zellen (Manel et al. 2008)

Zudem wird die Beteiligung von T_H17-Zellen an Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen, so auch beim Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa, vermutet (Harrington et al. 2005; Stockinger und Veldhoen 2007). Bereits 2003 wurde eine erhöhte Anzahl von IL-17 in den entzündeten Darmgebieten von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, im Vergleich mit den Darmgeweben gesunder Personen, entdeckt (Fujino et al. 2003). In einigen weiteren Studien konnte die Beteiligung der T_H17-Zellen und ihrer proinflammatorischen Zytokine an der Entzündungsreaktion bei CED zusätzlich belegt werden (Elson et al. 2007; McGovern und Powrie 2007; Monteleone et al. 2009).

1.1.3.3. Regulatorische T-Zellen

Bereits in den frühen 1970er Jahren wurde von Gershon und Kondo eine T-Zell-Linie beschrieben, die in der Lage zu sein schien, andere T-Zellen zu inhibieren und somit die Selbsttoleranz des Immunsystems zu regulieren (Gershon et al. 1972; Gershon und Kondo 1970). In den folgenden Jahren standen diese sogenannten T-Suppressorzellen im Fokus zahlreicher Studien, obgleich ihre Existenz weiterhin kritisch hinterfragt wurde (Bloom et al. 1992; Moller 1988). Bis zur Mitte der 1990er Jahre wurde die Forschung an dieser Zellpopulation aufgrund mangelnder Fortschritte und fehlender molekularer Marker nahezu eingestellt, bis Sakaguchi et al. 1995 feststellten, dass Mäuse, deren Anzahl an CD4⁺CD25⁺-Zellen stark vermindert wurde, an diversen Autoimmunerkrankungen litten (Sakaguchi et al. 1995). Diese Tatsache deutete darauf hin, dass CD4-positive Zellen, welche zusätzlich den IL-2-Rezeptor (CD25) exprimieren, an der Regulation von Autoimmunität maßgeblich beteiligt sind. 1998 zeigten daraufhin zwei Forschungsgruppen, dass CD4⁺CD25⁺-Zellen *in vitro* dazu

fähig sind, die Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen über einen direkten Zell-zu-Zell-Kontakt zu inhibieren (Takahashi T et al. 1998; Thornton und Shevach 1998).

Diese regulatorische T-Lymphozyten sind somit durch die Expression des Oberflächenmarkers CD4 und der Alpha-Untereinheit des IL-2-Rezeptors (CD25) charakterisiert (Sakaguchi et al. 1995). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CD4⁺-Zellen, welche außerdem CD25 in besonders hoher Anzahl exprimieren (CD25^{high}), bessere inhibitorische bzw. regulatorische Eigenschaften besitzen, als diejenigen, die CD25 nur in geringer Anzahl exprimieren (Baecher-Allan et al. 2001). Diese CD4⁺CD25^{high}-T-Zellen machen ungefähr 1-2% der gesamten CD4⁺-T-Zellen im peripheren Blut aus (Baecher-Allan et al. 2001; Buckner 2010).

Im Zuge weiterer Untersuchungen wurde festgestellt, dass das Oberflächenmolekül CD25 jedoch auch auf Antigen-aktivierten T-Zellen, den sogenannten Effektor-T-Zellen, exprimiert wird. Somit stellte sich die Identifizierung regulatorischer T-Zellen lediglich anhand der Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 als zu unspezifisch heraus und es wurden weitere molekulare T_{reg}-Marker mit höherer Spezifität benötigt (Shevach 2002; Ziegler 2006).

Diverse Antigene wie das CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*), das GITR (*glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor family-related gene*) und das LAG-3 (*lymphocyte activation gene-3*) wurden in regulatorischen T-Zellen entdeckt. Da sich jedoch auch diese Moleküle nicht ausschließlich auf den natürlichen regulatorischen T-Zellen befanden, waren sie für deren Identifizierung nur bedingt von Nutzen (Corthay 2009).

Als vielversprechender T_{reg}-Marker wurde 2001 das Forkhead-Box-Protein 3 (FoxP3) und das entsprechende *FoxP3*-Gen bei der Erforschung immundefizienter „*scurfy*“ Mäuse entdeckt (Brunkow et al. 2001). Das *FOXP3*-Gen ist auf dem X-Chromosom an der Stelle Xp 11.23 lokalisiert und es konnte belegt werden, dass mit der Deletion des *FOXP3*-Gens der Mäuse eine Überproliferation der CD4-positiven Effektorzellen und ein Fehlen der CD4⁺CD25⁺-Zellen einherging. Zudem konnte durch einen Transfer von CD4⁺CD25⁺-Zellen in die immundefizienten Mäuse eine Linderung ihrer Autoimmunerkrankung erzielt werden (Brunkow et al. 2001; Ziegler 2006). Diese Mutation im *FOXP3*-Gen wurde schließlich auch in der menschlichen DNA nachgewiesen. Sie manifestiert sich im IPEX- oder auch XLAAD-Syndrom, bei dem durch die dysfunktionalen T_{regs} verschiedene Autoimmunphänome u.a. des Gastrointestinaltraktes, der Haut und des endokrinen Systems beobachtet wurden (Bennett et al. 2001; Bennett und Ochs 2001; Wildin et al. 2001).

Gegenwärtig stellt das FoxP3-Protein als intrazellulärer Transkriptionsfaktor den durchflusszytometrisch messbaren Marker mit der höchsten Spezifität für regulatorische T-Zellen dar und ist sowohl für Funktion als auch Entwicklung von regulatorischen T-Zellen von essentieller Bedeutung (Fontenot et al. 2003; Khattri et al. 2003; Ziegler 2006). Es konnte gezeigt werden, dass aus *FoxP3*-defizienten bzw. -mutierten Stammzellen keine $CD4^+CD25^+$ -Zellen entstehen können, während Stammzellen mit intaktem *FoxP3*-Gen diese Zellen hervorbringen. Es stellte sich allerdings heraus, dass der Transkriptionsfaktor FoxP3 auch in einem Subset aktivierter $CD4^+$ -T-Zellen und $CD8^+$ -T-Zellen transient exprimiert wird und somit nicht ausschließlich in natürlich vorkommenden T_{reg} vorzufinden ist (Gavin et al. 2006; Morgan et al. 2005; Roncador et al. 2005; Walker et al. 2003). Somit gilt es zwischen natürlichen („*natural occurring*“), direkt aus dem Thymus stammenden, regulatorischen T-Zellen, den sogenannten nT_{reg} und den induzierbaren („*induced*“) regulatorischen T-Zellen, den sogenannten iT_{reg} zu unterscheiden (Curotto de Lafaille und Lafaille 2009; Zhu und Paul 2008).

Weiterhin wurde postuliert, dass die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 in T_{reg} von einer epigenetischen DNA-Regulation durch Methylierung abhängig ist (Baron et al. 2007; Floess et al. 2007). Für diesen Regulationsmechanismus existiert eine T_{reg} -spezifische Demethylisierungsregion (TSDR), welche bei regulatorischen T-Zellen demethyliert ist, während sie bei allen anderen Zellen im peripheren Blut methyliert zu sein scheint. Es konnte gezeigt werden, dass selbst bei aktivierten T-Zellen, die nur transient *FOXP3* exprimieren, die TSDR methyliert ist (Baron et al. 2007). Nur im demethylierten Zustand dieser Region wird *FoxP3* exprimiert. Im methylierten Zustand hingegen wird die DNA an dieser Stelle nicht abgelesen. Somit besteht mit dieser DNA-Demethylisierungsregion ein T_{reg} -spezifischer epigenetischer Marker, anhand dessen im Vergleich mit der Durchflusszytometrie eine genauere T_{reg} -Quantifizierung möglich sein sollte (Wieczorek et al. 2009).

Auf der Suche nach weiteren T_{reg} -spezifischen molekularen Oberflächenmarkern wurde die α -Kette des Interleukin-7 (IL-7)-Rezeptors, auch als CD127 bezeichnet, entdeckt. CD127 ist auf nahezu allen $CD4^+$ -Zellen vorhanden, wird jedoch auf den Zellen mit suppressorischer Fähigkeit im Verhältnis zu den Effektor-T-Zellen nur sehr gering exprimiert (Liu W et al. 2006).

Zusammenfassend werden regulatorische T-Zellen somit gegenwärtig durchflusszytometrisch besonders anhand des Oberflächenmoleküls CD4, des intrazellulären Transkriptionsfaktors FoxP3 (FOXP3) sowie anhand einer hohen Expressionsrate von CD25 und einer niedrigen Expressionsrate von CD127 identifiziert (Corthay 2009).

Abgesehen von den bisher beschriebenen nT_{regs} und iT_{regs} existieren noch weitere Populationen regulatorischer T-Zellen. Hierunter fallen z.B. die Tr1- und T_H3 -Zellen, welche in der Peripherie des Immunsystems entstehen können (Zhu und Paul 2008). Der Fokus dieser Arbeit liegt jedoch auf der weiteren Erforschung der nT_{regs} , welche folgend in dieser Arbeit synonym als T_{regs} bezeichnet werden.

1.1.3.3.1. Funktionen regulatorischer T-Zellen

Regulatorische T-Zellen besitzen die wichtige Funktion der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz des Immunsystems und dienen damit unter anderem der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen (Sakaguchi et al. 2006). Das Fehlen oder die Fehlfunktion regulatorischer T-Zellen scheint mit diversen Immunopathien, wie einer Autoimmungastritis, einer Autoimmunthyreoiditis, der Multiplen Sklerose, dem Typ-I-Diabetes oder den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert zu sein (Sakaguchi et al. 1995; Singh et al. 2001; Valencia und Lipsky 2007; Viglietta et al. 2004). Darüber hinaus führt eine Mutation im *FOXP3*-Gen zu einer X-chromosomal vererbten polyendokrinen Immunopathie, dem sogenannten IPEX- oder XLAAD-Syndrom (Bennett et al. 2001; Bennett und Ochs 2001; Ochs et al. 2007; Wildin et al. 2001). Das IPEX-Syndrom wird als eine Kombination diverser Autoimmunphänomene der Haut, des Gastrointestinaltraktes und besonders des endokrinen Systems beschrieben (Bennett et al. 2001; Bennett und Ochs 2001; Ochs et al. 2007; Wildin et al. 2001).

Weiterhin besitzen T_{regs} die Fähigkeit der Suppression allergischer Geschehen (Akbari et al. 2002; Curotto de Lafaille et al. 2001; Zuany-Amorim et al. 2002) und pathogen-induzierter Autoimmunerkrankungen, wie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (Asseman et al. 2000; Eastaff-Leung et al. 2010; Kullberg et al. 2002; Maul, 2005; Mottet et al. 2003).

T_{regs} sind zudem in der Lage, die T-Zellaktivierung bei einem schwachen Antigen-Stimulus zu unterdrücken (Baecher-Allan et al. 2002), die Immunantwort der T_H -Zellen zu kontrollieren (Oldenhove et al. 2003), die Effektorklasse der Immunantwort zu regulieren (Corthay 2009), für die mütterliche Toleranz gegenüber ihrem Feten zu sorgen (Aluvihare et al. 2004) und die

Unterdrückung einer Immunreaktion auf kommensalische oder symbiotische Mikroorganismen zu gewährleisten (Singh et al. 2001).

Die genauen Funktionsmechanismen regulatorischer T-Zellen sind bis heute nicht umfassend geklärt, jedoch ist bekannt, dass T_{regs} im anergen Zustand durch IL-2 und über ihren T-Zell-Rezeptor zur Proliferation stimuliert werden (Buckner 2010; Furtado et al. 2002) und die Zytokine IL-4, IL-10 und TGF β bilden können. Sie besitzen die Fähigkeit, $CD4^+CD25^-$ -T-Zellen, $CD8^+$ -T-Zellen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und B-Zellen an ihrer Aktivierung, Proliferation und Funktion zu hindern (Sakaguchi 2004; von Boehmer 2005). In verschiedenen Untersuchungen mit IL-10- und TGF β -defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass T_{regs} ihre suppressiven Fähigkeiten auch ohne die Sekretion dieser Zytokine wahrnehmen können (Jonuleit et al. 2001; Roncarolo et al. 2006; Sakaguchi et al. 2009). Hingegen scheinen für die Unterdrückung einer induzierten chronisch-entzündlichen Darmerkrankung in Mäusen IL-10 und TGF β von essenzieller Bedeutung zu sein (Asseman et al. 1999; Read et al. 2000). Zudem wird angenommen, dass IL-35, Galektin-1 und Kohlenstoffmonoxid von T_{regs} sezerniert werden und an der Unterdrückung von Autoimmunität beteiligt sind (Collison et al. 2007; Garin et al. 2007; Lee et al. 2007).

Durch die räumliche Trennung regulatorischer T-Zellen von aktivierten T-Zellen mit einer semipermeablen Membran konnte gezeigt werden, dass ein Zell-zu-Zell-Kontakt zur Suppression der T-Zell-Proliferation durch T_{regs} notwendig ist (Takahashi T et al. 1998; Thornton und Shevach 1998). Bei dieser zellkontaktabhängigen Suppression spielt der Kontakt des Oberflächenmoleküls CTLA-4 auf T_{regs} mit CD80 oder CD86 auf aktivierten T-Zellen eine entscheidende Rolle, denn in Mäusen führte die Blockade von CTLA-4 mit Antikörpern zu verschiedenen Autoimmunerkrankungen, welche mit denen von FoxP3-defizienten Mäusen zu vergleichen waren (Read et al. 2000; Takahashi T et al. 2000). CTLA-4-defiziente Mäuse entwickelten in einer weiteren Studie außerdem eine Splenomegalie, verschiedene Autoimmunerkrankungen und eine Überproduktion von IgE. Auch diese Erkrankungen glichen stark denen von FoxP3-defizienten Mäusen (Wing et al. 2008).

Bei der Funktion der regulatorischen T-Zellen besitzen zudem FoxP3, IL-2 und der IL-2-Rezeptor (CD25) eine entscheidende Funktion. Dies konnte anhand von Mäusen belegt werden, bei denen eine dieser Strukturen ausgeschaltet wurde, wodurch auch bei ihnen diverse Autoimmunerkrankungen entstanden sind (Bennett et al. 2001; Brunkow et al. 2001; Furtado et al. 2002; Malek et al. 2002). Der Transkriptionsfaktor FoxP3 scheint für die

regulatorischen T-Zellen von besonderer Bedeutung zu sein, denn genomweite Untersuchungen haben gezeigt, dass FoxP3 an Promotorregionen von 700 bis 1000 Genen bindet, wovon viele mit der Signalübertragung am T-Zell-Rezeptor assoziiert sind. FoxP3 arbeitet dabei teils als Transkriptions-Aktivator und teils als Transkriptions-Repressor dieser Gene (Marson et al. 2007; Zheng Y et al. 2007). Im Jahr 2003 wurde zudem von zwei verschiedenen Forschungsgruppen aufgezeigt, dass naive T-Zellen durch einen retroviralen Gentransfer von *FOXP3* suppressive Fähigkeiten erlangen können (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003). Dies unterstrich erneut die Relevanz des *FOXP3*-Gens für die Entwicklung und Funktionalität der regulatorischen T-Zellen.

Bezüglich der Antigen-Spezifität regulatorischer T-Zellen wurde in *in-vitro*-Experimenten dargestellt, dass T_{regs} über ihren T-Zell-Rezeptor mithilfe eines Antigens auf einem MHC-Klasse-2-Molekül aktiviert werden mussten, bevor sie ihre suppressiven Fähigkeiten wahrnehmen konnten (Corthay 2009; Thornton und Shevach, 1998). Zudem wurde belegt, dass auch die Proliferation von T_{regs} in Lymphknoten Antigen-abhängig ist (Yamazaki et al. 2003) und dass regulatorische T-Zellen mit einer Spezifität für die Antigene eines bestimmten Organs oder mit der Spezifität für ein Antigen besser zur Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen geeignet sind als polyklonale T_{regs} (Huter et al. 2008; Tang et al. 2004; Tarbell et al. 2004; Tonkin et al. 2008).

Von zunehmender Bedeutung für die Krebsforschung erscheint die erhöhte Anzahl von T_{regs} im peripheren Blut bei Patienten mit soliden Tumoren (Beyer und Schultze 2006; Liyanage et al. 2002; Ormandy et al. 2005; Sasada et al. 2003; Viguiet et al. 2004). Dieser Zusammenhang könnte darauf hindeuten, dass mit der steigenden Quantität von regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut das Immunsystem zunehmend an der Bekämpfung von Tumoren gehindert wird.

1.2. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen manifestieren sich als kontinuierlich oder rezidivierend verlaufende Entzündungen des Darms und sind durch eine verminderte Toleranz des Immunsystems gegenüber intestinalen Bakterien charakterisiert (Baumgart und Sandborn 2007; Sartor 2006; Strober et al. 2007). Die beiden häufigsten chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen stellen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa dar. Bei beiden Erkrankungen besteht eine erhöhte Aktivität der intestinalen, zellulären Immunität

(Duchmann et al. 1995; Mow et al. 2004). Die Entzündung manifestiert sich beim Morbus Crohn transmural und kann den gesamten Gastrointestinaltrakt betreffen, während die Colitis ulcerosa sich hauptsächlich auf die Mukosa und Submukosa des Colons beschränkt (Baumgart 2009).

In Deutschland leiden mehr als 300.000 Personen an chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Die Inzidenz und Prävalenz ist in den letzten zehn Jahren, besonders für den Morbus Crohn, stetig gestiegen (Baumgart 2009). In Nord-Europa liegt die CED-Inzidenz bei 12 bis 19 Erkrankungen pro 100.000 Personen pro Jahr (Loftus 2004; Matricon et al. 2010). Gegenwärtig steigen Inzidenz und Prävalenz an CED-Patienten in Asien (Goh und Xiao 2009), besonders in Ost-Asien (Thia et al. 2008), in Ost-Europa (Lakatos et al. 2006) und generell den Entwicklungsländern kontinuierlich an (Loftus 2004). Immer häufiger wird die Diagnose auch bei Kindern und Jugendlichen gestellt (Baumgart 2009). Als ursächlich für diese Steigerung der Neuerkrankungen werden sich verändernde Umweltfaktoren, eine gesteigerte Industrialisierung und sich verändernde Lebensgewohnheiten angegeben. Besonders das Rauchen scheint einen deutlichen Einfluss auf die Entstehung von Morbus Crohn zu haben (Loftus 2004; Sartor 2006).

Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen klagen je nach Lokalisation der Erkrankung über Beschwerden wie Bauchschmerzen, Diarrhö, Gewichtsverlust, Fieber, Darmverschlüsse und Hämatochezie (besonders bei Colitis ulcerosa). Vor allem beim Morbus Crohn führen Fistelbildungen und Darmverschlüsse häufig zu rezidivierenden Operationen. Die Progression und die Symptom-Ausprägung der Erkrankungen unterliegen einer interindividuellen Variabilität, jedoch werden die CED nach dem ECCO-Konsens und der Montreal-Klassifizierung lediglich in „*mild*“ (mild), „*moderate*“ (moderat) und „*severe*“ (schwer) unterteilt (Silverberg et al. 2005; Stange et al. 2006). Durch die häufig unvorhersehbaren Symptome der Erkrankungen und die Auswirkungen auf Beruf und Partnerschaft kommt es häufig zu einer Verminderung der Lebensqualität. (Graff et al. 2006). Zudem wird Colitis ulcerosa als eine Präkanzerose für ein Colon-Karzinom betrachtet und führt unter den Erkrankten, besonders unter jenen mit einer familiären Vorbelastung für ein kolorektales Karzinom, zu einer nicht zu vernachlässigenden psychischen Belastung (Rini et al. 2008).

1.2.1. Ursachen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen

Ogleich die Ätiologie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen nicht gänzlich geklärt ist wird angenommen, dass bei ihnen eine Dysregulation des Immunsystems besteht, welche zu einer stark erhöhten T-Zell-vermittelten Immunantwort auf die mikrobiotische Flora des Gastrointestinaltraktes führt (Matricon et al. 2010; Strober et al. 2007). Der Morbus Crohn ist dabei durch ein stark erhöhtes T_H1 - und T_H17 -Zytokin-Profil charakterisiert, während die Colitis ulcerosa eher mit einer erhöhten Aktivität der T_H2 -Zellen assoziiert ist (Cho 2008; Strober et al. 2007).

Es wird postuliert, dass den CED eine gastrointestinale Barrierestörung und eine Veränderung der mikrobiotischen Zusammensetzung des Darms zu Grunde liegen (Matricon et al. 2010; Strober et al. 2007; Xavier und Podolsky 2007). Zudem stellte sich in Experimenten heraus, dass für die Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen überhaupt eine Darmflora vorhanden sein muss, um die dysregulierte Immunreaktion zu begünstigen (Powrie et al. 1993; Strauch et al. 2005).

Im Zuge von genomweiten Untersuchungen wurden einige spezifische Gene identifiziert, welche mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert wurden (Nature 447 2007; Barrett et al. 2008). Die wichtigsten dieser Gene stehen entweder mit der angeborenen oder der erworbenen Immunabwehr in Verbindung (Matricon et al. 2010). So führten zum Beispiel Polymorphismen im *NOD2*-Gen und in den zwei Autophagozytose-assoziierten Genen *ATG16L1* und *IRGM* zu der Annahme, dass eine verminderte oder veränderte intrazelluläre Prozessierung von Bakterienbestandteilen bei der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen eine wichtige Rolle spielt (Cho 2008). NOD-Rezeptoren binden an Lipopolysaccharid- und Peptidoglykan-Bestandteile bakterieller Zellwände (sogenannte PAMPs), gehören somit zu den PRRs, und induzieren die Expression von antimikrobiellen Peptiden, zum Beispiel Defensinen (Inohara und Nunez 2003; Wilmanski et al. 2008). Des Weiteren sorgen NOD-Rezeptoren nach Aktivierung, durch bakterielle Bestandteile, besonders in Epithelzellen und Makrophagen für die Produktion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine (Inohara und Nunez 2003). Bei circa einem Drittel der MC-Patienten besteht eine Mutation im *NOD2*-Gen, welche zum einen zu einer verminderten Defensin-Bildung und somit zu einer verminderten Abwehr pathologischer oder fehlbesiedelter Bakterien im Gastrointestinaltrakt und zum anderen zu einer erhöhten Bildung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- α führt (Wehkamp

et al. 2009; Wilmanski et al. 2008). Während diese genetischen Veränderungen spezifisch für Morbus-Crohn-Patienten waren, kamen Veränderungen in Genen zum Beispiel des IL-23-Stoffwechselwegs bei MC- und bei CU-Patienten vor (Duerr et al. 2006; Lappalainen et al. 2008).

Die Bedeutung der regulatorischen T-Zellen für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase des Gastrointestinaltraktes wurde anhand von Mäusen, denen eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung experimentell induziert und anschließend mit injizierten regulatorischen T-Zellen geheilt wurde, deutlich (Aranda et al. 1997; Asseman et al. 2000; Mottet et al. 2003; Powrie et al. 1993; Singh et al. 2001). Es wurde zudem belegt, dass die Unterdrückung der entzündlichen Darmerkrankung in den Mäusen durch die transferierten T_{regs} IL-10- und TGF- β -abhängig, aber auch -unabhängig stattfinden konnte (Liu H et al. 2003; Uhlig et al. 2006). In einigen Studien wurde außerdem gezeigt, dass bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen die Anzahl der regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut invers mit der Krankheitsaktivität der Patienten korrelierte (Makita et al. 2004; Maul 2005; Saruta et al. 2007; Takahashi M et al. 2006). Ferner wurde in verschiedenen Studien aufgezeigt, dass in der Lamina propria, den mesenterischen Lymphknoten und der entzündeten Mukosa von CED-Patienten die Anzahl der regulatorischen T-Zellen, im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv, erhöht war (Makita et al. 2004; Maul 2005; Uhlig et al. 2006; Yu et al. 2007). Diese Entdeckungen deuten an, dass regulatorische T-Zellen mit dem Anspruch der Wiederherstellung der Immunhomöostase in die entzündeten Gebiete des Gastrointestinaltrakt einwandern und daher eine verminderte Anzahl an T_{regs} im peripheren Blut der CED-Patienten vorhanden ist (Holmen et al. 2006). Funktionelle Einschränkungen der T_{regs} in den entzündeten Geweben wurden bislang nicht entdeckt (Himmel et al. 2008; Holmen et al. 2006).

Im Mausmodell stellte sich heraus, dass regulatorische T-Zellen in einem proinflammatorischen Milieu in der Anwesenheit von IL-6 und der Abwesenheit von TGF- β die inflammatorischen Eigenschaften von $T_{\text{H}}17$ -Zellen annehmen können (Xu et al. 2007; Zheng SG et al. 2008). Eastaff-Leung et al haben zudem konstatiert, dass im peripheren Blut eines CED-Patienten ein erniedrigter Quotient von T_{regs} zu $T_{\text{H}}17$ -Zellen vorherrscht (Eastaff-Leung et al. 2010). In diesem reziproken Verhältnis zwischen proinflammatorischen $T_{\text{H}}17$ -Zellen und regulatorischen T-Zellen scheint IL-6 eine entscheidende Rolle zu spielen, indem es dazu fähig ist, T_{regs} zu unterdrücken, während es $T_{\text{H}}17$ -Zellen zu stimulieren vermag (Korn

et al. 2009; Strisciuglio und van Deventer 2010). Kürzlich konnte weiterhin an Mäusen verdeutlicht werden, dass regulatorische T-Zellen in der Lage sind, sowohl die T_H1 - als auch die T_H17 -Zell-Antwort mithilfe von TGF- β zu unterdrücken (Ogino et al. 2011).

Zusammenfassend wird nach heutigem Kenntnisstand an der Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen die Beteiligung einer Vielzahl von verschiedenen, sich gegenseitig beeinflussenden Faktoren aus genetischen Veränderungen, Umwelteinflüssen und Alterationen der Darmflora und des Immunsystems vermutet. Hierbei wird den regulatorischen T-Zellen eine nicht zu vernachlässigende Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und Unterdrückung von Autoreaktivität des Immunsystems beigemessen, während den übrigen $CD4^+$ -Zellen eine entscheidende Rolle bei der Ausführung der Immunreaktion im entzündeten Darmgewebe zugeschrieben wird.

1.2.2. Therapie von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Die Therapie der CED besteht zurzeit vor allem aus Immunsuppression und symptomatischer Behandlung. Dabei wird im akuten Schub des Morbus Crohn häufig zuerst das Glukokortikoid Budesonid verwendet. Dieses wirkt durch seinen hohen First-Pass-Effekt in der Leber vor allem lokal im Gastrointestinaltrakt (Otley und Steinhart 2005). Bei stärkeren Formen der Erkrankung wird ein systemisch wirksames Kortison-Präparat verwendet (Travis et al. 2006). Zur Remissionserhaltung dienen entweder die Immunsuppressiva Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Methotrexat oder ein TNF- α -Blocker (Baumgart 2009; Stange et al. 2006).

Bei der Colitis ulcerosa zeigt ein 5-ASA-Präparat, Mesalazin, im akuten Schub und bei der Remissionserhaltung gute Erfolge. Bei schwereren Verläufen kommen auch hier Budesonid oder systemisch wirksame Kortikoide zum Einsatz (Baumgart 2009). Bei einem unter Kortison therapierefraktären Verlauf von CED werden vor allem Azathioprin, 6-Mercaptopurin und Methotrexat angewendet. Als Reservepräparate gelten Infliximab oder Ciclosporin (Baumgart 2009; Baumgart et al. 2011).

Die verwendeten Immunsuppressiva, wie Azathioprin, bzw. der aktive Metabolit 6-Mercaptopurin, können schwere Nebenwirkungen, wie Veränderungen des Blutbildes, ein erhöhtes Infektionsrisiko, Haarausfall, Übelkeit, Durchfall, Erbrechen und Gewichtsabnahme verursachen. Zudem unterliegt 6-Mercaptopurin starken interindividuellen Unterschieden im Wirkspiegel. Dies kommt unter anderem durch einen Polymorphismus des Enzyms Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT) zustande. So haben 10 % der Bevölkerung eine deutlich

verminderte Enzymaktivität und etwa 0,3 % zeigen gar keine nachweisbare TPMT-Aktivität (Yates et al. 1997). Bei Patienten mit einer zu niedrigen TPMT-Enzymaktivität kann es somit zu Toxizitäten und Veränderungen des Blutbildes kommen, wenn 6-Mercaptopurin in den üblichen Dosen verabreicht wird und durch die fehlende oder verminderte Metabolisierung zu toxischen Blutspiegeln ansteigt (Hindorf et al. 2006).

1.3. Nutzen immunologischer Biomarker bei CED

Für eine individualisierte immunsuppressive Therapie sind neue Biomarker wünschenswert, da zum einen jeder Patient individuell auf eine immunsuppressive Therapie reagiert und zum anderen eine zu starke Immunsuppression das Risiko einer opportunistischen Infektion steigert (Oellerich et al. 2006; Wieland et al. 2010). Unerwünschte Arzneimittelwirkungen sollten zudem möglichst gering gehalten werden und aus diesem Grund ist es essentiell eine möglichst geringe Dosis an Immunsuppressiva zu verabreichen. Die Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen im Blut (Therapeutisches Drug Monitoring, TDM) ist zwar für einige, der bei CED verwendeten, Medikamente möglich, jedoch besteht damit keine Methode zur Kontrolle der Aktivität des Immunsystems. Mithilfe neuer Biomarker könnte man dem Bedarf an Immunsuppression der Patienten möglichst genau entsprechen bzw. Patienten identifizieren, die eine robustere Immunsuppression benötigen (Brandhorst et al. 2011; Oellerich et al. 2006; Wieland et al. 2010).

Des Weiteren liegt bei etwa 10 % der Fälle von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine indeterminierte Colitis vor, bei der eine Unterscheidung zwischen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn initial nicht möglich ist. In diesen Fällen könnten neue Biomarker einen Beitrag zur Initialdiagnostik leisten.

Weiterhin könnten Biomarker für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen dem Patienten im Einzelfall invasive und unangenehme Diagnosemethoden, wie die Koloskopie oder Gastroskopie ersparen.

Da der Morbus Crohn derzeit nicht heilbar ist und bei der Colitis ulcerosa nur eine Proktokolektomie zur Heilung führen kann, dient die Therapie der CED vor allem der Remissionserhaltung bzw. dem Herauszögern von Rezidiven. Dabei könnten geeignete Biomarker das jeweilige Krankheitsrezidiv-Risiko objektivierbar machen. Es wäre somit möglich, das Risiko eines akuten Krankheitsschubes vorherzusehen und diesem mit einer adäquaten Therapie zeitnah entgegenzuwirken.

Zurzeit sind keine validen Biomarker verfügbar, die eine Individualisierung der Therapie und Überwachung des Immunsystems bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ermöglichen. Im Zuge dieser Arbeit sollen zum einen die ATP-Konzentrationen in CD4⁺-Zellen und zum anderen die Anzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut von CED-Patienten auf ihren Nutzen als immunologische Biomarker für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen untersucht werden.

1.3.1. ATP-Immune-Cell-Function-Assay

Der Cylex[®] Immune Cell Function Assay dient der Abschätzung des zellulären Immunstatus eines Patienten und wird vorwiegend zur Verlaufskontrolle nach Organtransplantation verwendet. Bei dieser von Kowalski et al etablierten Methode wird die Immunantwort der CD4⁺-Lymphozyten anhand ihrer intrazellulären ATP-Konzentration gemessen (Kowalski et al. 2003; Kowalski et al. 2006).

Einige Studien haben gezeigt, dass die Höhe der iATP-Konzentration nicht nur mit dem Abstoßungs-Risiko des transplantierten Organs, sondern auch invers mit dem Infektions-Risiko des Patienten korreliert (Batal et al. 2008; Bhorade et al. 2008; Cabrera et al. 2009; Kowalski et al. 2003; Kowalski et al. 2006; Mendler et al. 2008; Reinsmoen et al. 2008; Sanchez-Velasco et al. 2008; Schulz-Juergensen et al. 2012; Xue et al. 2010).

Da in der Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen die CD4-positiven Zellen eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen, stellte sich für dieses Projekt die Frage, ob der Immunstatus eines an Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa erkrankten Patienten mithilfe des *Cylex[®] Immune Cell Function Assays* effektiv kontrolliert werden kann.

1.3.2. Quantifizierung Regulatorischer T-Zellen

Eine weitere Möglichkeit den Immunstatus eines Patienten zu beurteilen, bietet die Bestimmung regulatorischer T-Zellen.

Sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen korreliert das Fehlen der T_{regs} mit einer hochgradigen Autoimmunität (Brunkow et al. 2001; Ochs et al. 2007). Zudem wurde bei Personen, die an dem Immundysregulations-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X-chromosomalen Syndrom (IPEX-Syndrom) leiden, eine Mutation im *FOXP3*-Gen regulatorischer T-Zellen festgestellt. Diese Patienten entwickeln verschiedene

Autoimmunerkrankungen, wie eine Autoimmunendokrinopathie, eine Autoimmunthyreoiditis, einen Autoimmundiabetes und eine Autoimmunenteropathie (Buckner 2010; Ochs et al. 2007). Daraus wurde gefolgert, dass den T_{regs} eine entscheidende Bedeutung bei der Verhinderung von diversen Autoimmunerkrankungen zukommt.

Maul et al haben bereits 2005 gezeigt, dass eine erhöhte Krankheitsaktivität von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen mit einer erniedrigten Anzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut der Patienten einhergeht (Maul 2005). Zudem wurde in dieser Studie belegt, dass die T_{regs} der CED-Patienten über eine starke suppressive Aktivität verfügen und keine funktionellen Schäden besitzen. Takahashi M. et al konnten 2006 diese Ergebnisse bestätigen. Es wurde erläutert, dass Patienten mit einer aktiven Colitis ulcerosa, verglichen mit gesunden Probanden und mit CU-Patienten in Remission, eine verringerte Anzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut besaßen (Takahashi M et al. 2006). Später haben Eastaff-Leung et al festgestellt, dass im peripheren Blut von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine verringerte Anzahl regulatorischer T-Zellen einer erhöhten Anzahl T_H17 -Zellen gegenüber steht (Eastaff-Leung et al. 2010).

Mit dieser Arbeit sollte zum einen überprüft werden, ob diese Ergebnisse bezüglich der Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und der Anzahl der regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut der Patienten reproduzierbar sind. Zum anderen sollte untersucht werden, inwiefern sich die Quantifizierung regulatorischer T-Zellen mithilfe der FACS-Analytik von der Quantifizierung mittels eines DNA-Methylierungs-Assays in Hinsicht auf die Korrelation mit der Krankheitsaktivität der Patienten unterscheidet.

1.4. Zusammenfassung der Ziele der Arbeit

1. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die Bestimmung der intrazellulären ATP-Konzentration in CD4-positiven Lymphozyten eignet, um zwischen einem aktiven Schub und der Remission von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu unterscheiden. Es sollte somit herausgefunden werden, ob sich die iATP-Konzentrationen der $CD4^+$ -Zellen als Surrogatparameter der Krankheitsaktivität von CED-Patienten eignen.

Zudem sollte ermittelt werden, ob bezüglich der beiden Krankheiten Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Unterschiede vorhanden sind und ob sich die lymphozytären

ATP-Konzentrationen bei Patienten mit und ohne Glukokortikoid-, Azathioprin- oder Infliximab-Therapie voneinander unterscheiden.

2. Weiterhin sollte mit dieser Arbeit die Bedeutung von regulatorischen T-Lymphozyten im peripheren Blut der CED-Patienten untersucht werden. Bezüglich der regulatorischen T-Zellen sollten Unterschiede zwischen den beiden chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, auch im Hinblick auf eine Glukokortikoid- oder Azathioprin-Therapie, herausgearbeitet werden.
3. Die beiden etablierten Verfahren der Quantifizierung regulatorischer T-Zellen sollten auf ihren Zusammenhang mit dem Remissionsstatus der CED-Patienten miteinander verglichen werden. In diesem Vergleich sollten die T_{regs} zum einen anhand der FACS-Analyse bzw. Durchflusszytometrie und zum anderen mithilfe eines DNA-Methylierungs-Assays quantifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Biologisches Material

2.1.1. Antikörper

Alle Antikörper, die für die FACS-Analytik verwendet wurden, stammen von BD Pharmingen™ (Franklin Lakes, NJ, USA).

Anti-CD127	Alexa Fluor® 647 Mouse anti-human CD127 (Klon HIL-7R-M21)
Anti-CD25	PE-Cy™ 7 Mouse Anti-Human CD25 (Klon M-A251)
Anti-CD4	FITC Mouse Anti-Human CD4
Anti-FoxP3	PE Mouse anti-Human FoxP3 (Klon 259D/C7)
IgG1 Isotyp	PE Mouse IgG1 K Isotyp Control

2.2. Chemikalien

Dimethylsulfoxid	Fluka, Buchs, Schweiz
------------------	-----------------------

2.3. Gebrauchswaren

Falcon® 5 ml FACS-Röhrchen mit Cell-Strainer Cap	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Falcon® 50 ml Konisches Röhrchen	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Pasteurpipetten 150 mm	Wilhelm Ulbrich GdB, Mainz
Probenröhrchen 15ml, 120x17mm, PP	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht

2.4. Geräte und Software

CELL-DYN Sapphire	Abbott, Wiesbaden
cobas® 6000 Systemfamilie	Roche Diagnostics AG, Mannheim
Data Analysis Calculator™	Cylex Immuknow, Columbia, MD, USA

FACSCanto™ II flow cytometer	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
FACSDiva™ -Software	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Herafreeze HFU-Basic -80°C	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Inkubator Cytoperm 2	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
LightCycler® 480	Roche Applied Science, Mannheim
Luminometer GloRunner™	Turner BioSystems, Sunnyvale, CA, USA
Magnetstreifen, Cylex Magnet Tray	Cylex Immuknow, Columbia, MD, USA
Multikanalpipette Research 300	Eppendorf AG, Hamburg
Multipette® Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Reference Pipette	Eppendorf AG, Hamburg
Schüttler MicroMix 5	Siemens Sector Healthcare, Erlangen
Spektrophotometer DU-7500	Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
Stoppuhr	Oregon Scientific, Neu-Isenburg
Vakuumpumpe pipet aid®	Drummond Scientific Company, Broomall, PA, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Wasserbad GFL Typ 1003	Krannich GmbH und Co., Göttingen
Wasserstrahlpumpe	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Zentrifuge Sepatech Varifuge 3.0R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

2.5. Kits

Cylex® Immune Cell Function Assay	Cylex Immuknow, Columbia, MD, USA
enthält :	
- Mikrotiterplatte und Abdeckung	
- Sample Diluent	
- Phytohämagglutinin-Stimulanz	
-- Dynabeads® CD4	Dynal Biotech A.S.A., Oslo, Norway
- Waschpuffer	
- Lyse-Reagenz	
- Kalibrator-Reagenzien	
- Lumineszenz-Reagenz	
- Messplatte	

EZ DNA Methylation-Gold™ Kit	Zymo Research Corporation, Irvine, CA, U.S.A.
LightCycler® 480 Probes Master Kit	Roche Applied Science, Mannheim
NucleoSpin® Blood QuickPure Kit	Machery-Nagel GmbH und Co. KG, Düren

2.6. Puffer und Lösungen

Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GMBH, Pasching, Österreich
Entionisiertes H ₂ O	Hauseigene Herstellung
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Human FoxP3 Buffer A (10x)	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Human FoxP3 Buffer B	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Human FoxP3 Buffer C (50x)	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Human FoxP3 Stain Buffer	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Lymphoprep™ 250ml	Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway
NaCl 0,9%	Braun Melsungen AG, Melsungen
RPMI	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

2.7. Studiendesign

Insgesamt wurden 100 Patienten mit Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa in Übereinstimmung mit den Ethikrichtlinien der Universitätsmedizin Göttingen und nach positivem Votum der Ethikkommission in diese Studie eingeschlossen. Die Patienten wurden aus der Abteilung für Gastroenterologie und Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen und der Abteilung für Gastroenterologie des Evangelischen Krankenhauses Weende rekrutiert. Nach Aufklärung und Einverständnis der Patienten wurden mithilfe von Patientenfragebögen krankheitsbezogene Daten erhoben. Von jedem Patienten wurden zusätzlich drei Blutproben entnommen. Mit den gewonnenen Proben wurde die intrazelluläre, lymphozytäre ATP-Konzentration (*Cyflex™ ImmuKnow® Assay*), ein maschinelles Differentialblutbild und die Albumin- und CRP-Konzentrationen bestimmt. Außerdem wurden mononukleäre Zellen für die FACS-Analyse der FoxP3-exprimierenden T-Zellen

isoliert und ein DNA-Methylierungs-Assay zur Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen durchgeführt.

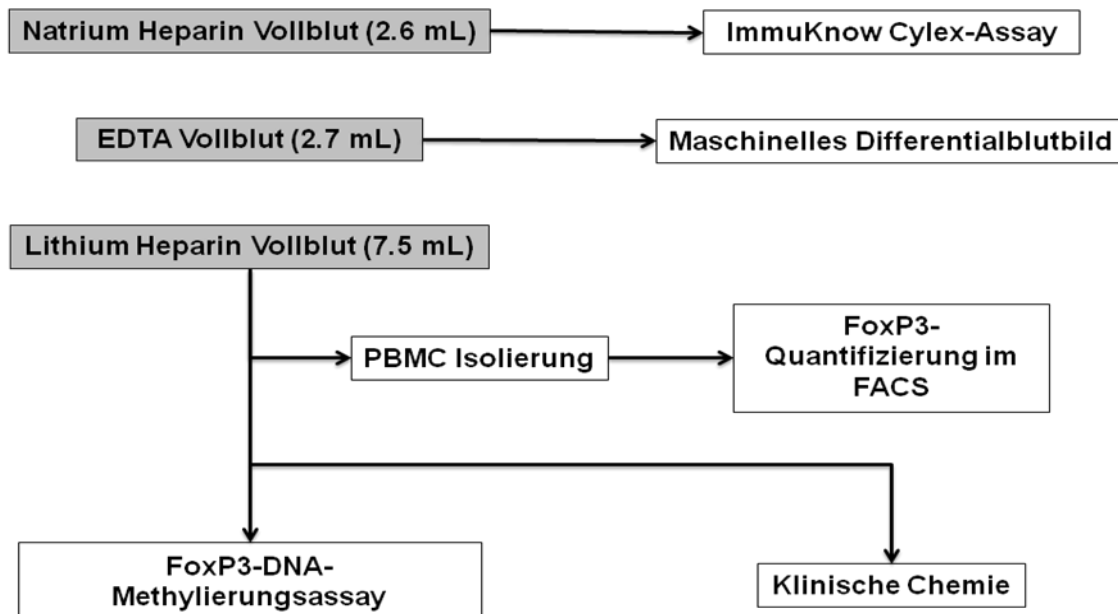


Abbildung 1: Darstellung der Probenprozessierung. Mit dem Vollblut eines Natrium-Heparin-Röhrchens wurde der *Cylex™ ImmuKnow® Assay* durchgeführt. Das EDTA-Vollblut diente dem maschinellen Differentialblutbild und Lithium-Heparin-Vollblut wurde zur Herstellung von PBMCs und zur anschließenden FACS-Analytik, zur Bestimmung der CRP- und Albuminkonzentrationen und für den FoxP3-DNA-Methylierungsassay genutzt.

2.8. Patientenfragebögen und Krankheitsaktivitätsindices

Die Patientenfragebögen erfassen persönliche Basisdaten, wie Alter, Geschlecht und Gewicht der Patienten, sowie krankheitsbezogene Daten zur Ermittlung eines Krankheitsaktivitäts-Index (Patientenfragebögen, Einverständniserklärung und Aufklärungsbogen befinden sich im Anhang).

Für die Morbus-Crohn-Patienten wurde der *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI) anhand von verschiedenen klinischen und laborchemischen Parametern errechnet (Best et al. 1976). Die klinischen Parameter umfassten die Häufigkeit von flüssigen Stuhlgängen und Bauchschmerzen, sowie das durchschnittliche Allgemeinbefinden der letzten Woche und extraintestinale Manifestationen der Erkrankung. Außerdem wurde nach einer Gewichtsänderung und der aktuellen Medikation gefragt. Die Unterteilung erfolgte nach Stange et al. in vier Schweregrade. Dabei stellten Werte zwischen 150 und 220 eine milde Aktivität der Erkrankung dar, während Werte zwischen 220 und 450 auf eine moderate

Aktivität hindeuteten. Werte über 450 zeigten eine schwere Krankheitsaktivität auf. Ein Wert unter 150 deutete auf einen Patienten in Remission hin (Stange et al. 2006).

Zudem wurde für die Morbus-Crohn-Patienten der *Harvey-Bradshaw-Index* (HBI) als vereinfachte Version des CDAI bestimmt. Er errechnete sich aus den klinischen Angaben. Für den HBI wurde eine Remission durch einen Index-Wert unter 5 charakterisiert. Eine milde Krankheitsaktivität wurde für Werte von 5 bis 7, eine moderate Krankheitsaktivität für Werte von 8 bis 16 und eine starke Krankheitsaktivität für Werte von über 16 festgelegt.

Für die Colitis-ulcerosa-Patienten wurde der *SCCAI* (*Simple Clinical Colitis Activity Index*) aus den klinischen Patientenangaben errechnet (Walmsley et al. 1998). Die Colitis-ulcerosa-Patienten wurden mithilfe der Fragebögen zu ihrem Allgemeinbefinden, der Häufigkeit von Stuhlgängen am Tag und in der Nacht, sowie zur Stärke des Stuhldrangs befragt. Des Weiteren gab es Fragen nach extraintestinalen Manifestationen der Erkrankung, dem Gewicht, der Medikation und dem Vorhandensein von Hämatochezie. Für den SSCAI wurden Werte ab 5 als erhöhte Krankheitsaktivität definiert.

	CDAI	HBI	SCCAI
Remission	<150	<5	<5
Milde Krankheitsaktivität	150-220	5-7	>5
Moderate Krankheitsaktivität	220-450	8-16	
Starke Krankheitsaktivität	>450	>16	

Tabelle 1: Darstellung der verschiedene Aktivitätsstufen der Krankheitsaktivitätsindices (CDAI, HBI und SCCAI) und ihrer Grenzwerte.

2.9. Klinisch-chemische Parameter

Die CRP- und Albumin-Konzentrationen der Patienten-Proben wurden an einem cobas® 6000-Analysesystem in dem nach DIN ISO 15189 und 17025 akkreditierten Zentrallabor der Abteilung Klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen gemessen. Die Messungen erfolgten entsprechend den Herstellervorgaben (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

2.9.1. C-reaktives Protein

Die Bestimmung der Konzentration des C-reaktiven Proteins erfolgte mittels Latexpartikeln, welche mit monoklonalen Anti-CRP-Antikörpern beschichtet sind. Bei diesem immunturbidimetrischen Test absorbieren und streuen die gebildeten Latex-CRP-Agglutinine eingestrahltes Licht in der Messzelle. Das Ausmaß der Licht-Absorption ist nach dem Lambert-Beer-Gesetz proportional zur CRP-Konzentration. (Eda et al. 1998; Price et al. 1987)

2.9.2. Albumin

Das Testprinzip zur Ermittlung der Albumin-Konzentration beruht auf einem Farbttest. Albumin bildet bei einem pH-Wert von 4,1 mit dem Anionenfarbstoff Bromkresolgrün (BCG) einen Albumin-BCG-Komplex. Dieser Komplex wird photometrisch gemessen. Die Intensität der photometrisch gemessenen blaugrünen Farbe ist proportional zur Albumin-Konzentration. (Doumas et al. 1971)

2.10. Maschinelles Differential-Blutbild

Das Differential-Blutbild der Patienten wurde mit einem CELL-DYN® Sapphire-Analysegerät erstellt. Aus dem EDTA-antikoagulierten Blut jedes Patienten konnten die Leukozyten, die Erythrozyten und die Thrombozyten quantifiziert werden. Zusätzlich wurden die Leukozyten differenziert und die Hämoglobin-Konzentration (Hb), der Hämatokrit (Hkt), das Mittlere Korpuskuläre Hämoglobin (MCH), die Mittlere Korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration (MCHC) und das Mittlere Erythrozytenvolumen (MCV) ermittelt. Das CELL-DYN® Sapphire-Analysegerät arbeitet mit verschiedenen Funktionsprinzipien zur vollautomatischen Blutanalyse. Die Messungen erfolgten mit einem Widerstands-*Transducer*, mit einer optischen Durchflussküvette und mit einer Hämoglobin Durchflussküvette.

Die Leukozyten wurden im Sapphire-Analysegerät mithilfe der Durchflusszytometrie (siehe Durchflusszytometrie, Seite 30) in der optischen Durchflussküvette gemessen und anhand ihres, aus vier Winkeln detektierten, Streulichts in Monozyten, neutrophile Granulozyten, basophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und Lymphozyten differenziert.

Erythrozyten und Thrombozyten wurden mithilfe des Widerstandsmessprinzips gezählt und der Größe nach klassifiziert. Bei dieser Impedanzmessung wurden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung einzeln durch eine Kapillaröffnung geführt. Beim Durchtritt

der Zellen durch die Kapillaröffnung veränderte sich die elektrische Spannung über einem Messwandler. Es entstand ein elektrisches Signal, welches proportional zum Zellvolumen ist. Anhand dieses Zellvolumens wurde die Zelle der jeweiligen Zellpopulation zugeordnet und gezählt.

Die Hämoglobinkonzentration wurde mittels Absorptionsphotometrie bei einer Wellenlänge von 544 nm gemessen. Bei diesem Analyseverfahren wurde Blut in der Hämoglobin-Durchflussküvette mit Licht bestrahlt und dieses anschließend detektiert. Aus der Menge des absorbierten Lichts bzw. aus der Transmission lässt sich die Hämoglobinkonzentration errechnen.

2.11. Cylex®-ImmuKnow®-Assay

2.11.1. Hintergrundinformation

Zum Monitoring der CD4⁺-T-Zell-vermittelten Immunantwort der Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa wurden die Natrium-Heparin-Vollblutproben mit Phytohämagglutinin stimuliert und 15-18 Stunden inkubiert, um anschließend die intrazelluläre ATP-Konzentration der CD4-positiven Zellen zu messen. Hierzu wurde ein kommerzieller Assay, der Immune Cell Function Assay (ImmuKnow®), der Firma Cylex® verwendet. Das Testprinzip besteht darin, eine mit einem Puffer verdünnte Blutprobe mit Phytohämagglutinin (PHA) für 15 bis 18 Stunden zu inkubieren und damit die Lymphozyten zu einer erhöhten ATP-Synthese bzw. zur Proliferation zu stimulieren (Ishizaka et al. 1984; Kowalski et al. 2003; Snyder et al. 1976; Sottong et al. 2000). Dieses lymphozytäre Adenosintriphosphat kann anschließend quantifiziert werden und dient der Abschätzung des zellulären Immunstatus des Patienten. Folgend den vorgegebenen Referenzwerten für die intrazellulären ATP-Konzentrationen, stellen ATP-Konzentrationen unter 225 ng/mL eine schwache Immunantwort, ATP-Konzentrationen zwischen 225 und 525 ng/mL eine moderate Immunantwort und ATP-Konzentrationen über 525 ng/mL eine hohe Immunantwort dar (Batal et al. 2008; Kowalski et al. 2003; Kowalski et al. 2006).

2.11.2. Durchführung

Die Durchführung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben (Cylex Immuknow, Columbia, MD, USA). Als erstes wurde eine 1:4 Verdünnung aus 750 µl Sample Diluent und 250 µl Natrium-Heparin Blut des jeweiligen Patienten hergestellt. Um eine gleichmäßige Verteilung der Blutbestandteile zu gewährleisten, wurden die Blutproben vor der Verdünnung geschwenkt. Daraufhin wurde auf einer Mikrotiterplatte für jede Patienten-Probe ein Streifen mit jeweils acht Kammern genutzt. Der erste Streifen wurde für einen gesunden Kontrollpatienten und die weiteren Streifen für die Patientenproben verwendet. In die ersten vier Kammern eines Streifens wurden jeweils 25 µl *Sample Diluent* und in die letzten vier Kammern jeweils 25 µl der PHA-Lösung pipettiert. Danach wurden jeweils 100 µl des verdünnten Blutes in jede der acht Kammern eines Streifens pipettiert. Anschließend wurde die Assay-Platte auf einem Mikrotiter *Plate Shaker* für 30 Sekunden geschüttelt und für 15-18 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die CD4-positiven Zellen mit jeweils 50 µl Anti-CD4 monoklonalen, magnetischen Antikörpern (*Dynabeads*[®] CD4) inkubiert und durch Magnete von den restlichen Blutbestandteilen isoliert. Mit einer Vakuumpumpe wurde das übrige Blut abgesaugt. Dies geschah sowohl mit den vier PHA-stimulierten, als auch mit den vier nicht stimulierten Proben-Kammern. Durch drei Waschvorgänge mit einem Waschpuffer wurden die CD4-positiven Zellen von Verunreinigungen mit anderen Zellen und Blutbestandteilen gesäubert. Nach dem Waschen wurde zu den CD4-positiven Zellen 200 µl Lyse-Reagenz hinzugegeben, um das intrazelluläre ATP freizusetzen. Als nächstes wurden 50 µl aus jeder der Kammern der Assay-Platte in die Kammern einer Mess-Platte überführt. Zudem wurden noch jeweils 50 µl Kalibrator-Substanz mit den ATP-Konzentrationen von 0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml in verschiedene aufeinanderfolgende Kammern pipettiert. In jede Kammer der Mess-Platte wurden anschließend 150 µl Lumineszenz-Reagenz (Luciferin/Luciferase) pipettiert, um das freigewordene ATP für das Luminometer sichtbar zu machen. Die Mess-Platte wurde dann 30 Sekunden auf dem Plate-Shaker geschüttelt und konnte innerhalb von drei bis zehn Minuten im Luminometer gemessen werden. Die Gleichung zu der Licht-bildenden Reaktion lautet:



Die Lichtmenge wurde mit einem Emissionsmaximum von 562 nm gemessen und als relative Licht-Einheiten (RLU) in der PC-Software berechnet. Die RLU-Daten wurden mithilfe der *ImmuKnow® Data Analysis Calculator-Software* in ATP ng/ml konvertiert. Die RLU sind proportional zu der ATP-Konzentration und die Umrechnung in ng/ml geschah anhand einer ATP-Kalibrationskurve, die bei jedem Assay-Lauf durch die Messung der Kalibrator-Reagenzien erstellt wurde. Da jede stimulierte und nicht stimulierte Probe in vierfacher Ausführung gemessen wurde, konnte aus den vier Werten das arithmetische Mittel errechnet werden, um eine höhere Präzision der Ergebnisse zu erzielen.

Für die Validität des Assays mussten bestimmte Kriterien erfüllt sein. Bei jedem Lauf wurde der ATP-Wert aus einer Kontrollprobe mitbestimmt. Die ATP-Ergebnisse der nicht-stimulierten Kontrollprobe sollten unter 60 ng/ml und die der stimulierten über 240 ng/ml liegen. Des Weiteren sollte der errechnete ATP-Wert für den 1000 ng/ml ATP-Kalibrator zwischen 900 und 1100 ng/ml liegen, der errechnete Wert für den 100 ng/ml ATP-Kalibrator zwischen 95 und 115 ng/ml und der Korrelationskoeffizient der ATP-Kalibrationskurve größer oder gleich 0,97 sein. Zusätzlich sollte der Variationskoeffizient, also die Standardabweichung geteilt durch den Mittelwert, unter 20% liegen. War dies nicht der Fall, sollte nach einem Ausreißer-Wert gesucht, dieser entfernt und ein neuer Mittelwert aus den drei verbliebenen Werten berechnet werden.

2.12. PBMC-Isolierung

2.12.1. Hintergrund

Die Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) erfolgte gemäß dem Lymphoprep®-Protokoll. Diese Methode zur Isolierung mononukleärer Zellen wurde 1968 von Dr. Arne Böyum beschrieben und etabliert. Die Methode basiert darauf, dass mononukleäre Zellen eine andere spezifische Dichte als Erythrozyten und Granulozyten besitzen. Die Mehrheit der mononukleären Zellen haben eine geringere Dichte als 1.077 g/ml und können deshalb durch Zentrifugation mit einer isoosmotischen Lösung (Lymphoprep®-Lösung) mit einer Dichte von 1.077 g/ml isoliert werden. Erythrozyten und die Granulozyten besitzen eine höhere Dichte als 1.077 g/ml und sedimentieren deshalb durch die Lösung auf den Grund des Falconröhrchens, während sich die mononukleären Zellen aufgrund ihrer geringeren Dichte an der Grenzschicht zwischen NaCl mit Plasma und

der Lymphoprep®-Lösung als weißlicher Saum bzw. weißliche Schicht sammeln. (Boyum 1968)

2.12.2. Durchführung

In einem 50-ml-Falcon-Röhrchen wurden 7,5 ml Lithium-Heparinat Vollblut mit der gleichen Menge physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) verdünnt. Des Weiteren wurden in zwei Reagenz-Röhrchen mit 15 ml Fassungsvermögen jeweils 3 ml Lymphoprep®-Lösung pipettiert. Anschließend wurden jeweils 5-6 ml von dem verdünnten Blut über die 3 ml Lymphoprep®-Lösung geschichtet. Dabei sollten zwei Phasen entstehen, ohne sich miteinander zu vermischen. Als nächstes wurden die beiden Röhrchen bei 800 x *g* und 20 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Die Lymphozyten-Schicht wurde mithilfe einer Pasteur-Pipette abgenommen, in ein weiteres 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 2 ml NaCl verdünnt. Anschließend wurde ein zweites Mal bei 500 x *g* für 10 Minuten zentrifugiert und danach die obere, wässrige Schicht mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dieser Waschschrift diente dazu die mononukleären Zellen von Verunreinigungen mit der Lymphoprep®-Lösung, Erythrozyten oder Thrombozyten zu reinigen. Es musste darauf geachtet werden, dass das PBMC-Zellpellet am Boden des Falconröhrchens belassen wurde. Dieses Zellpellet wurde anschließend mit 900 µl FCS resuspendiert und mit 100 µl DMSO für das Einfrieren vorbereitet. Das DMSO reduziert die Bildung von Wassereiskristallen, Elektrolytverschiebungen und die Denaturierung intrazellulärer Proteine der Probe während des Einfrierens (Bakhach 2009). Die gewonnene PBMC-Suspension wurde auf zwei 2-ml-Proben-Röhrchen aufgeteilt und in einem *Cryo-Container* bei -80°C eingefroren. Das Abkühlen der Proben in einem *Cryo-Container* erfolgte mit ca. 1°C pro Stunde und war damit besonders zellschonend.

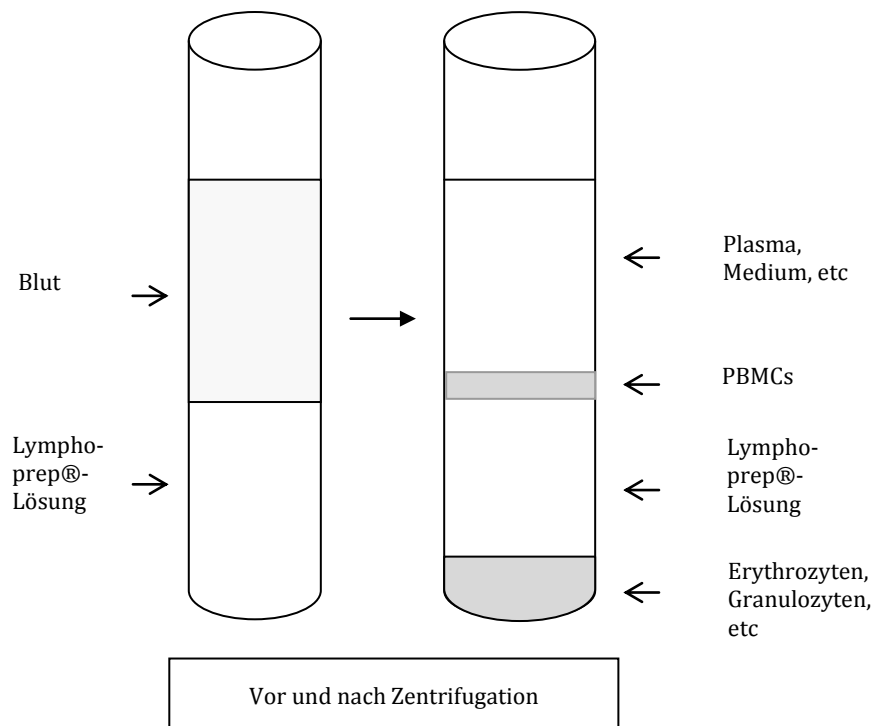


Abbildung 2: Isolierung mononukleärer Zellen mittels Lymphoprep®-Dichtegradientenzentrifugation.

Im Lymphoprep®-Dichtegradienten lassen sich nach der Zentrifugation verschiedene Zellschichten unterscheiden: Die oberste Schicht besteht aus Medium und kleinsten Partikeln wie Thrombozyten. Darunter befindet sich eine dünne Schicht mit den mononukleären Zellen. Dann folgt eine Schicht mit der Lymphoprep®-Lösung. Die Erythrozyten und Granulozyten befinden sich am Boden des Falconröhrchens.

2.13. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren zur Analyse, Quantifizierung und Sortierung von Zellen anhand verschiedener physikalischer Zelleigenschaften. Die Bezeichnung FACS steht für *Fluorescence Activated Cell Sorting* und ist ein Markenname der Firma Becton Dickinson.

Die Durchflusszytometrie stellt ein Verfahren dar, bei dem die Zellen einer Zellsuspension mit Überdruck durch eine Kapillare beschleunigt werden. In der Durchflusszelle passieren sie daraufhin durch die sogenannte hydrodynamische Fokussierung einzeln einen Laserstrahl. Dabei werden die Zellen zu optischen Signalen angeregt, welche mithilfe von Detektoren gemessen werden. Je nach Größe, Oberflächenbeschaffenheit und Granularität der Zellen entstehen Streulichter, welche in unterschiedlichen Winkeln detektiert werden (Arndt-Jovin und Jovin 1974; Dittrich und Gohde 1969; Hulett et al. 1969).

Das Vorwärtsstreulicht (FSC) entsteht durch eine Beugung von Licht in einem flachen Winkel, fast in Richtung des Laserstrahls und ist ein Maß für das Volumen der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC) entsteht durch die Brechung des Lichtes im rechten Winkel zum Laserstrahl und ist abhängig von der Struktur des Zellkerns, der Granularität und der Größe der Zelle.

Durch das Auftragen des FSC auf der x-Achse gegen das SSC auf der y-Achse in einem sogenannten Dot-Plot entsteht eine, für die mononukleären Zellen, charakteristische Aufteilung der Zellen. Lymphozyten können dabei von Granulozyten und Monozyten unterschieden werden.

Mithilfe von Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen können bestimmte Antigene von Zellen bei der Bestrahlung mit Lasern bestimmter Wellenlängen zur Emission von Licht angeregt und detektiert werden. So wurden in diesem Projekt Zellen quantifiziert, die sowohl die Oberflächenantigene CD4 und CD25^{high}, als auch den intrazellulären Transkriptionsfaktor FOXP3 exprimieren und den Oberflächenmarker CD127 nicht oder nur sehr gering ausprägen (CD127⁻). Zellen mit diesen Oberflächenmerkmalen sind nach Liu W. et al mit großer Reinheit regulatorische T-Lymphozyten (Liu W et al. 2006). Das FoxP3-Protein stellt als intrazellulärer Transkriptionsfaktor gegenwärtig den spezifischsten durchflusszytometrischen Marker für regulatorische T-Zellen dar und ist sowohl für Funktion als auch Entwicklung von regulatorischen T-Zellen von essentieller Bedeutung (Fontenot et al. 2003; Khattri et al. 2003; Ziegler 2006).

In der folgenden Tabelle werden die bei diesem Projekt verwendeten Antikörper, Fluoreszenzfarbstoffe und Emissions-Wellenlängen aufgeführt.

Fluorochrom-Farbstoffe	Fluoreszenz-Emissions-Farben	Emissions-Wellenlänge (nm)
FITC	Grün	519
PE-Cy TM 7	Infrarot	785
Alexa Fluor [®] 647	Rot	668
PE	Gelb	578

Tabelle 2: Darstellung der verwendeten Fluorochrom-Farbstoffe und ihrer, bei Bestrahlung entstehenden, Fluoreszenz-Emissions-Farben und der dazu benötigten Emissionswellenlängen.

2.13.1. Durchflusszytometrische Messung von regulatorischen T-Zellen

Zur Identifizierung der regulatorischen T-Zellen wurde nach dem modifizierten Protokoll zur Zellvorbereitung und Anfärbung für die *Anti-Human FOXP3* Antikörper von BD-PharmingenTM angefärbt und anschließend in einem *FACSCanto II flow cytometer* mit der *FACSDiva Software* gemessen und ausgewertet.

Die zuvor isolierten und bei -80°C eingefrorenen PBMCs wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die Proben wurden mit ca. 2 ml PBS verdünnt und danach bei 250 x *g* für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand durch Dekantieren entfernt und die Zellen wurden mit 2 ml Vollmedium (RPMI) mit Serumzusatz resuspendiert. Dieser Waschschrift diente dazu um zu verhindern, dass die PBMCs Schaden an dem, sich noch in der Probe befindlichen, toxischen DMSO nahmen (Bakhach 2009). Die Proben wurden daraufhin mindestens 3,5 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese PBMC-Suspension erneut bei 250 x *g* für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde durch Dekantieren entfernt. Die Proben wurden dann mit 400 µl *Human FoxP3 Stain Buffer* verdünnt und jeweils auf zwei FACS-Röhrchen aufgeteilt. Ein Röhrchen sollte für die spätere Inkubation mit dem FOXP3-Antikörper und eines für die Isotyp-Kontrolle genutzt werden.

Anschließend wurden zur Anfärbung der entsprechenden Oberflächenantigene der PBMCs jede Probe mit 20 µl CD4-Antikörper, 5 µl CD25-Antikörper und 20 µl CD127-Antikörper nach kurzem Mischen für 20 Minuten bei Raumtemperatur, im Dunkeln inkubiert. Als nächstes wurden zu jeder Probe 2 ml Waschpuffer hinzugefügt und für zehn Minuten bei 250 x *g* zentrifugiert. Der Waschpuffer wurde entfernt und das übrige Zellpellet mit 2 ml, des zehnfach mit entionisiertem Wasser verdünnten, Puffer A resuspendiert. Dieser Puffer diente der Fixierung der Zellen. Daraufhin wurden die Proben erneut im Vortexer gemischt, für zehn Minuten im Dunkeln inkubiert und bei 500 x *g* für fünf Minuten zentrifugiert. Der Puffer wurde durch Dekantieren entfernt und die Proben anschließend wieder mit 2 ml Waschpuffer gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden die Proben mit jeweils 0,5 ml, des 50 fach mit Puffer A verdünnten, Puffer B resuspendiert. Nach erneutem Mischen im Vortexer wurden die Proben für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach folgte ein weiterer Waschschrift um den übrigen Puffer zu entfernen.

Als nächstes wurden zum intrazellulären Anfärben in jeweils eine der Proben 20 µl des konjugierten FOXP3-Antikörpers und in jeweils die andere Probe 10 µl von der IgG1 Isotyp-

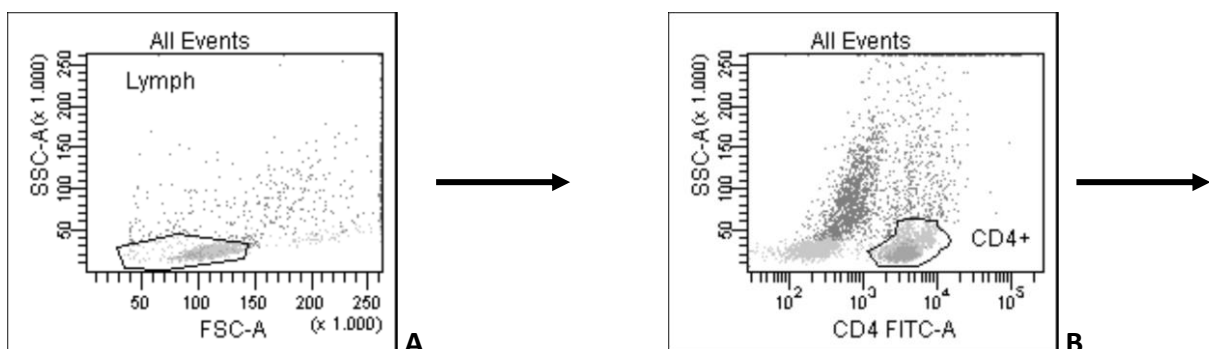
Kontrolle gegeben. Nach einem vorsichtigen Schwenken oder Vortexen wurde erneut für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Daraufhin folgte ein letzter Waschschrift und die Proben konnten im *FACSCanto II flow cytometer* gemessen werden.

2.13.2. Gating-Strategie

Mithilfe der *FACSDiva™-Software* wurden in einem *Dot-Plot* (Punktwolkendarstellung) die gemessenen Intensitäten des FSC auf der x-Achse gegen die des SSC auf der y-Achse aufgetragen. So entstand die übliche Zellverteilung, mit Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Die Population der Lymphozyten wurde dann mithilfe eines sogenannten *Gates* markiert und konnte dadurch in einem weiteren *Dot-Plot* in Hinsicht auf ihre Fluoreszenz untersucht werden. Mithilfe von *Gates* können verschiedene, gemessene Merkmale miteinander verknüpft und in einem weiteren Diagramm ohne die übrigen Merkmale dargestellt werden. Aus der Lymphozytenpopulation wurden so die CD4-positiven, die CD25-hoch-positiven Zellen, die CD127-negativen und die FOXP3-positiven Zellen miteinander verknüpft dargestellt.

Um unspezifische Bindungen der FOXP3-Antikörper an diverse Blutbestandteile nicht als FOXP3-exprimierende Zellen zu zählen, wurde mittels des IgG-Isotyp-Kontroll-Antikörpers (aus dem gleichen Organismus wie der FOXP3-Antikörper) die unspezifische Hintergrundfärbung ermittelt und vom Messwert der regulatorischen T-Zellen subtrahiert.

Es wurden falls möglich mindestens 50.000 Ereignisse mithilfe der *FACSDiva™-Software* aufgezeichnet. Die Anzahl der Tregs wurde als Anteil von den gesamten CD4-positiven Zellen in Prozent dargestellt.



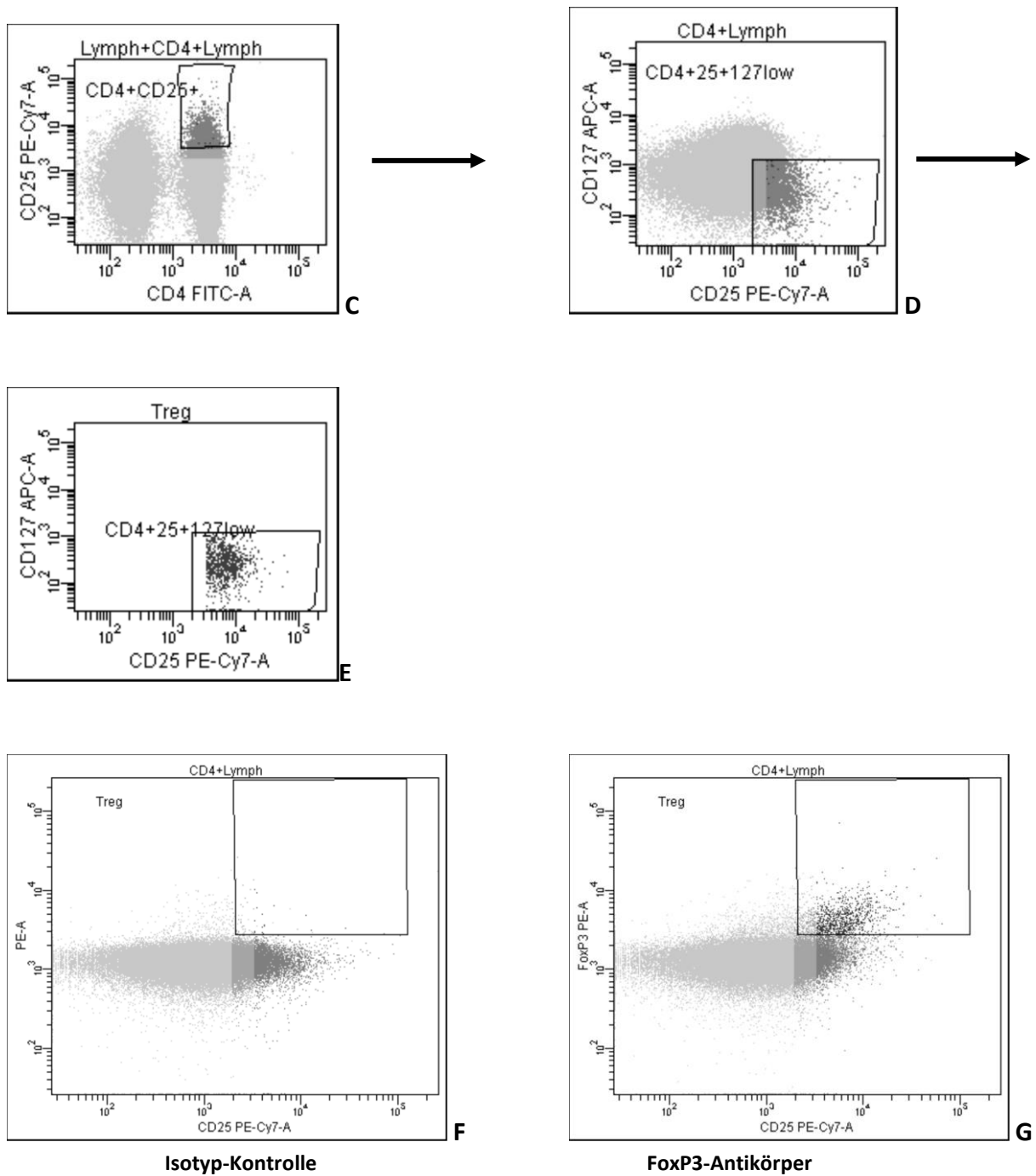


Abbildung 3: Darstellung der in der FACS-Analytik verwendeten *Gating-Strategie*. Mithilfe des *Forward- und Sideward-Scatter* wurde die Lymphozyten-Population dargestellt (siehe A). Daraufhin wurden innerhalb der Lymphozyten die $CD4^+$ -Zellen mit einem Gate belegt (siehe B) um anschließend daraus die $CD25^{\text{high}}$ -Zellen (siehe C) und die $CD127^-$ -Zellen mit jeweils einem weiteren Gate zu verknüpfen (siehe D und E). Danach wurde ein Gate auf die Region der $FoxP3^+$ -Zellen gelegt (siehe F und G) und mit der Isotyp Kontrolle die unspezifische Hintergrundfärbung bzw. Autofluoreszenz der Zellen ermittelt (siehe F). Mit der FoxP3-Antikörper-Probe wurden die $FoxP3^+$ -Zellen dargestellt. Die Anzahl der, mithilfe der Isotyp-Kontrolle gemessenen, Ereignisse wurden von denen der $FoxP3^+$ -Zellen subtrahiert, um die reguläre Anzahl der regulatorischen T-Zellen, als Anteil von der Gesamtheit der $CD4^+$ -Zellen, zu ermitteln.

2.14. FOXP3-DNA-Methylierungs-Analyse

Die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 in Tregs ist von einer epigenetischen DNA-Regulation durch Methylierung abhängig (Baron et al. 2007; Floess et al. 2007). Für diesen Regulationsmechanismus existiert eine Treg-spezifische Demethylisierungsregion (TSDR). Diese Region ist bei regulatorischen T-Zellen demethyliert, während sie bei allen anderen Zellen des Blutes methyliert ist. Es konnte gezeigt werden, dass selbst bei aktivierten T-Zellen, die nur transient FOXP3 exprimieren die TSDR methyliert ist (Baron et al. 2007). Nur im demethylierten Zustand dieser Region wird FOXP3 exprimiert, während im methylierten Zustand die DNA an dieser Stelle nicht abgelesen wird. Somit besteht mit dieser DNA-Demethylisierungsregion ein Treg-spezifischer epigenetischer Marker, anhand dessen die Anzahl der regulatorischen T-Zellen einer Blutprobe mit einer FOXP3-DNA-Methylierungs-Analyse quantifiziert werden kann.

Für die DNA-Methylierungsanalyse wurden 200 µl der Lithium Heparinat Vollblut-Proben aliquotiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C eingefroren.

2.14.1. Genomische DNA-Isolierung

Nach dem Auftauen der Probe wurde aus ihr die genomische DNA nach dem „*NucleoSpin*[®] *Blood QuickPure*“-Protokoll isoliert.

Zur DNA-Isolierung erfolgte eine Zelllyse mittels Proteinase K und einer Pufferlösung mit chaotropen Ionen. Anschließend wurde eine Affinitätschromatographie mithilfe von „*NucleoSpin*[®] *Blood Columns*“ durchgeführt. Bei der Affinitätschromatographie wurde sich die Zentripetalbeschleunigung einer Zentrifuge zunutze gemacht, indem in einem *NucleoSpin*[®] *Blood Column*-Röhrchen eine Membran aus Kieselerde die DNA beim Zentrifugieren an sich bindet, während die übrigen Blutbestandteile der Probe auf den Grund des Röhrchens gelangen. Aus der Membran konnte die DNA schließlich durch einen Elutionspuffer von der Membran gelöst und mit entionisiertem Wasser verdünnt werden. Nach der Isolierung wurde die DNA-Konzentration in einer Quarzküvette mit einem Photometer bestimmt. Die DNA-Probe wurde bei -20°C zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.14.2. DNA-Denaturierung und Bisulfit-Reaktion

Des Weiteren wurde nach dem *EZ DNA Methylation-GoldTM Kit*-Protokoll die DNA denaturiert und eine Bisulfit-Reaktion nach Olek et al. durchgeführt. Mittels der Bisulfit-Reaktion wurde das nicht methylierte Cytosin der DNA (CPG-Dinukleotide) zu Uracil desaminiert (Olek et al. 1996). Das methylierte Cytosin blieb dabei unverändert. In der folgenden PCR-Amplifikation wurde Uracil als Thymidin (TPG) amplifiziert, sodass die Detektion von einem Cytosin bei der Sequenzierung eine methylierte DNA-Stelle repräsentiert, während die Detektion von einem Thymidin eine nicht-methylierte DNA darstellt.

2.14.3. Fluoreszenz-basierte quantitative Real-time PCR

Die Fluoreszenz-basierte quantitative Real-time PCR wurde mit dem *LightCycler[®] 480* von Roche basierend auf dem FRET-Prinzip durchgeführt. Bei dem Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer-Prinzip (FRET) wird Energie von einem Fluorophor-Donor oder Reporter ausgesendet und von einem angrenzenden Fluorophor-Akzeptor oder *Quencher* aufgenommen. Im Zuge der DNA-Amplifizierung spaltet die Taq-Polymerase, mithilfe ihrer Nukleaseaktivität, den Reporter vom *Quencher* und die daraufhin freiwerdende Energie des Reporters kann mit verschiedenen Laser-Detektoren gemessen werden (Chen et al. 1997; Wieczorek et al. 2009).

Die durch die Bisulfit-Reaktion veränderte DNA wurde zusammen mit fluoreszenzmarkierten Desoxyribonukleosidtriphosphaten, DNA-Taq-Polymerasen, einer Pufferlösung, TSDR-spezifischen *forward*- und TSDR-spezifischen *reverse-Primern* (Primersequenzen im Anhang) mithilfe des *LightCyclers[®]* in einer quantitativen Real-time PCR amplifiziert. Cytosin spiegelt dabei eine methylierte DNA-Stelle und ein Thymidin eine nicht-methylierte DNA-Stelle wieder. Zur Erhöhung der Präzision wurden eine Patienten-Probe, eine gesunde Kontrollprobe und eine Standardprobe jeweils in dreifacher Ausführung analysiert.

Die DNA-Amplifizierung und Sequenzierung wurden zum einen mit Primern für die methylierte *FOXP3*-DNA und zum anderen mit Primern für die nicht methylierte DNA durchgeführt. Als Surrogatparameter der *FOXP3*-exprimierenden Zellen konnte anschließend, anhand der Standardkurve, das prozentuale Verhältnis der Amplifikationen der nicht-methylierten von den methylierten Treg-spezifischen Demethylisierungsregionen

errechnet werden. Für weibliche Patienten wurde ein Korrektionsfaktor verwendet, da eines der zwei TSDR-Allele immer durch die X-Inaktivierung methyliert ist (Wieczorek et al. 2009).

3. Ergebnisse

3.1. Auswertung der Patientendaten

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die demographischen Daten der Patienten und die prozentualen Anteile der Patienten mit erhöhter Krankheitsaktivität entsprechend den verschiedenen Krankheitsaktivitätsindices. Außerdem wird die Verteilung der eingenommenen Medikamente der Patienten zusammenfassend dargestellt.

	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa
Anzahl	55	45
Geschlecht (m/w)	27/28	24/21
Alter in Jahren (Mittelwert, SD)	38,5 (11,5)	41,7 (15,4)

Indices	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa
CDAI > 150	21,8 %	
HBI > 5	65,5 %	
SCCAI > 5		55,6 %

Medikamente	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa
Azathioprin	22	18
Glukokortikoide (systemisch)	15	21
Mesalazin	14	24
Sulfosalazin	1	2
Ciclosporin	0	2
Infliximab	12	5
MTX	0	1
Adalimumab	6	0
Budesonid	15	6

Tabelle 3: Demographische und klinische Daten. Darstellung der Anzahl der Morbus-Crohn- und Colitis-ulcerosa-Patienten, der Geschlechtsverteilung des Patientenkollektivs, der Mittelwerte und Standardabweichungen des Patientenalters, des prozentualen Anteils der Personen mit erhöhter Krankheitsaktivität nach den verschiedenen Krankheitsaktivitätsindices und der Häufigkeit der einzelnen medikamentösen Therapien der Patienten.

3.2. Auswertung der Krankheitsaktivitätsindices

3.2.1. *Crohn's Disease Activity Index* der Morbus-Crohn-Patienten

Aus den klinischen und laborchemischen Parametern von den 55 Morbus-Crohn-Patienten wurde der jeweilige CDAI-Wert zur Bestimmung der Krankheitsaktivität errechnet. Die Werte erstreckten sich von 0 bis 490. Der Median der gesamten Werte lag bei 89,80, während der Median für die männlichen Patienten 75,60 und der Median der weiblichen Patienten 92,48 betrug. Ein geschlechtsabhängiger Unterschied in der Verteilung der Werte konnte nicht nachgewiesen werden ($p=0,077$, Mann-Whitney-U-Test).

Folgend der Schweregradeinteilung von Stange et al. (Stange et al. 2006) befanden sich 43 der Morbus-Crohn-Patienten in Remission. 10 Patienten besaßen eine milde Krankheitsaktivität und jeweils ein Patient besaß eine moderate bzw. einer eine schwere Krankheitsaktivität (siehe Abb. 4).

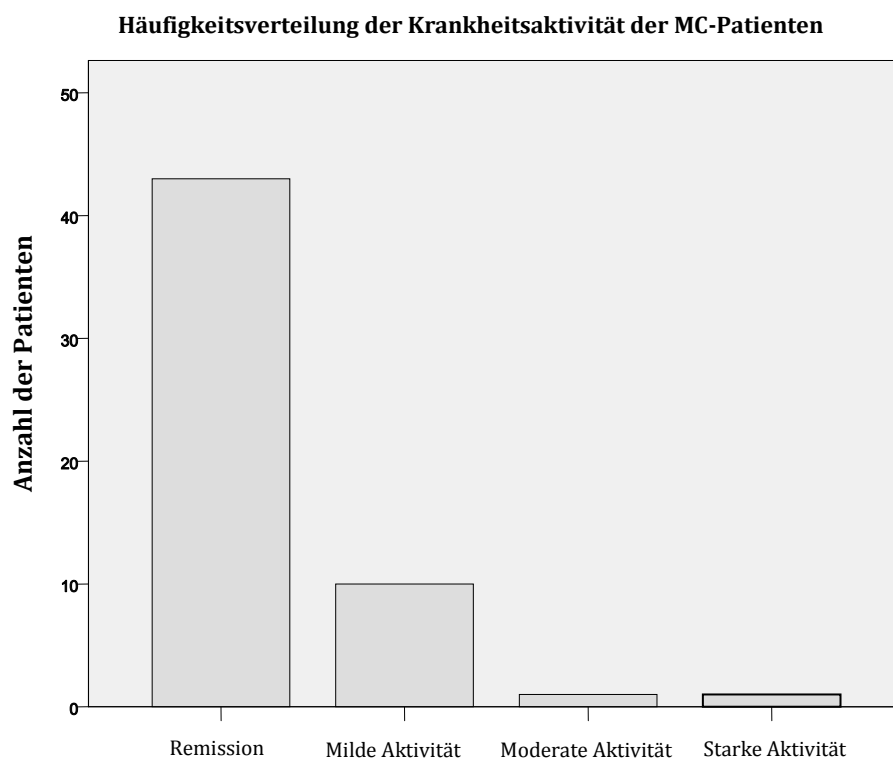


Abbildung 4: Darstellung der Häufigkeiten der einzelnen Krankheitsaktivitätsstufen der Morbus-Crohn-Patienten. Nach dem CDAI befanden sich 43 MC-Patienten in Remission und nur 12 Patienten besaßen eine erhöhte Krankheitsaktivität.

3.2.2. *Harvey-Bradshaw-Index* der Morbus-Crohn-Patienten

Zusätzlich zur Berechnung des CDAI wurde für alle Morbus-Crohn-Patienten der *Harvey-Bradshaw-Index* aus den klinischen Patientendaten ermittelt (Best 2006; Harvey und Bradshaw 1980). Der Mittelwert des HBI lag bei 6,47 und der Median bei 6,00. Der Mittelwert der männlichen Patienten lag bei 5,00 und der der weiblichen Patienten bei 7,00. Gemäß der Schweregradeinteilung des HBI bestand eine erhöhte Krankheitsaktivität bei Ergebnissen von über 5, eine milde Krankheitsaktivität bei Ergebnissen zwischen 5 und 7, eine moderate Krankheitsaktivität bei Ergebnissen zwischen 8 und 16 und eine stark erhöhte Krankheitsaktivität bei Ergebnissen von über 16 (Best 2006). Demzufolge besaßen in dieser Studie 36 Patienten eine erhöhte Krankheitsaktivität und 19 Patienten befanden sich in Remission des Morbus Crohn. Unter den Patienten mit einer erhöhten Krankheitsaktivität befanden sich 16 Patienten mit einer milden Krankheitsaktivität, 19 Patienten mit einer moderaten und ein Patient mit einer stark erhöhten Krankheitsaktivität (siehe Abb. 5). Nach dem HBI befanden sich somit wesentlich mehr Personen im akuten Schub bzw. besaßen eine erhöhte Krankheitsaktivität im Vergleich zum CDAI.

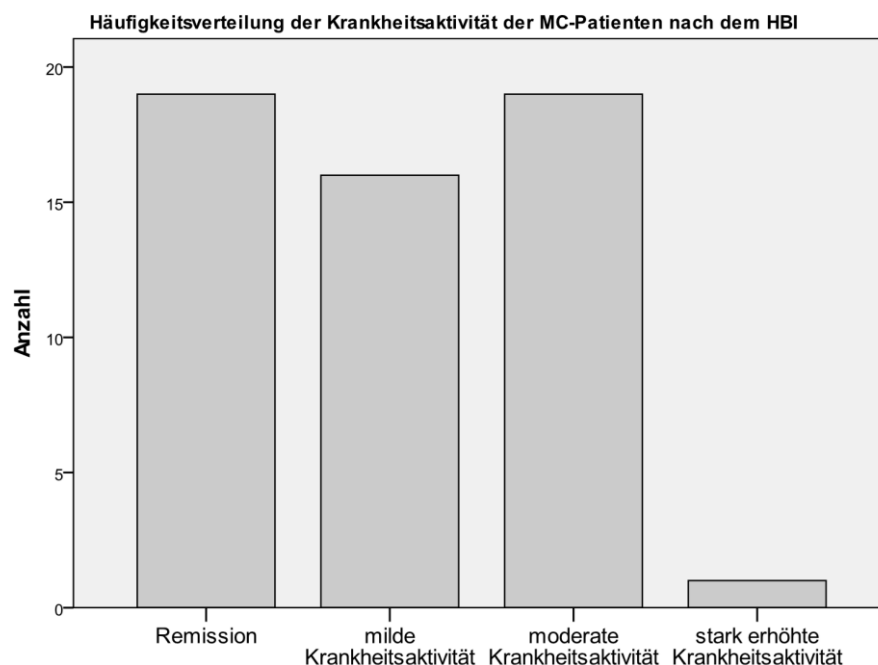


Abbildung 5: Darstellung der Häufigkeiten der einzelnen Krankheitsaktivitätsstufen der Morbus-Crohn-Patienten. Nach dem HBI befanden sich 19 MC-Patienten in Remission und 36 Patienten besaßen eine erhöhte Krankheitsaktivität.

3.2.3. Simple Clinical Colitis Activity Index

Aus den klinischen Angaben der 45 Colitis-ulcerosa-Patienten wurde der *Simple Clinical Colitis Activity Index* bestimmt. Die Ergebnisse lagen zwischen 0 und 12. Der Median lag bei 5,00 und der Mittelwert bei 5,31. Ausgehend von einer erhöhten Krankheitsaktivität ab einem SCCAI-Wert von 5 (Jowett et al 2001), besaßen 20 Colitis-ulcerosa-Patienten eine geringe und 25 Patienten eine erhöhte Krankheitsaktivität, bzw. befanden sich im akuten Schub der Erkrankung (siehe Abb. 6).

Da höhere Ergebnisse als 12 für den SCCAI der Colitis-ulcerosa-Patienten nicht erreicht wurden, befanden sich in diesem Kollektiv keine Patienten mit einer sehr hohen Krankheitsaktivität. Dies deckt sich auch mit den patienteneigenen Angaben zum Allgemeinbefinden, da im Patientenfragebogen auf die Frage zum Allgemeinbefinden höchstens „schlecht“, jedoch nie „sehr schlecht „oder „unerträglich“ angegeben wurde.

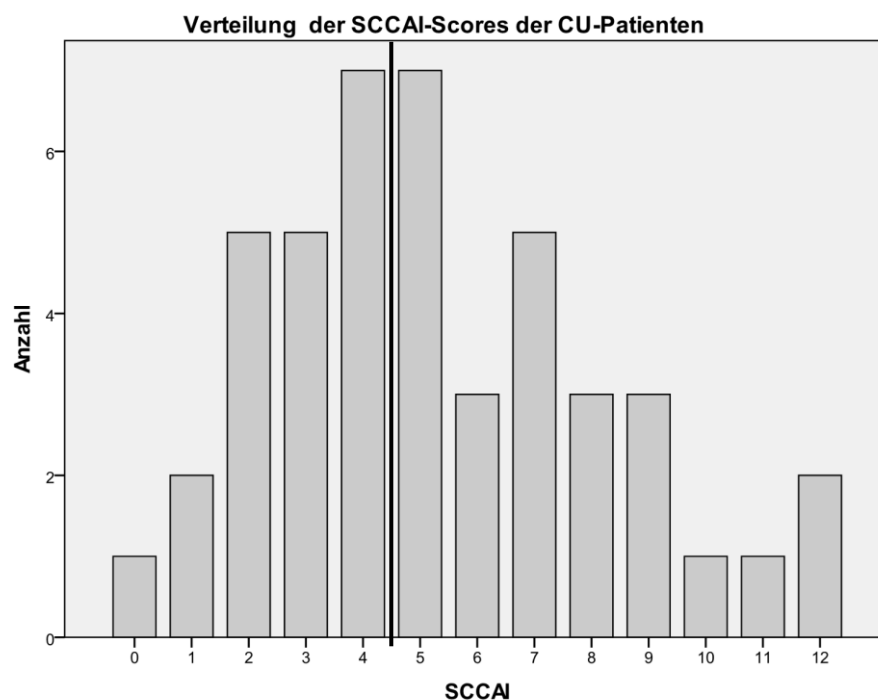


Abbildung 6: Darstellung der Häufigkeit der einzelnen SCCAI-Werte der CU-Patienten. Die errechneten Werte erstreckten sich von 0 bis 12 auf einer Skala von 0 bis 16. Die Linie zwischen 4 und 5 stellt die Grenze zwischen Remission und erhöhter Krankheitsaktivität der CU-Patienten dar.

3.2.4. Vergleich des CDAI mit dem HBI

Obwohl sich der CDAI und der HBI bezüglich der Anzahl der eingestuften Morbus-Crohn-Patienten in Remission und in erhöhte Krankheitsaktivität unterschieden, korrelierten beide Krankheitsaktivitäts-Indices in hohem Maße miteinander ($r=0,811$, $p<0,001$, Spearman-Rho) (siehe Abb. 7). Da der HBI zur Vereinfachung des CDAI eingeführt wurde und mit ähnlichen klinischen Angaben arbeitet, war diese Korrelation zu erwarten und deckte sich mit den Literaturangaben (Best 2006).

Im Vergleich der beiden Krankheitsaktivitätsindices mit den patienteneigenen Angaben zum Allgemeinbefinden korrelierte der HBI besser mit den Angaben der Patienten zum Allgemeinbefinden ($r=0,575$, $p<0,001$, Spearman-Rho) als der CDAI ($r=0,449$, $p=0,001$, Spearman-Rho). Aus diesem Grunde wurde in den nachfolgenden Untersuchungen in der Regel mit den Krankheitsaktivitätswerten aus dem HBI gearbeitet.

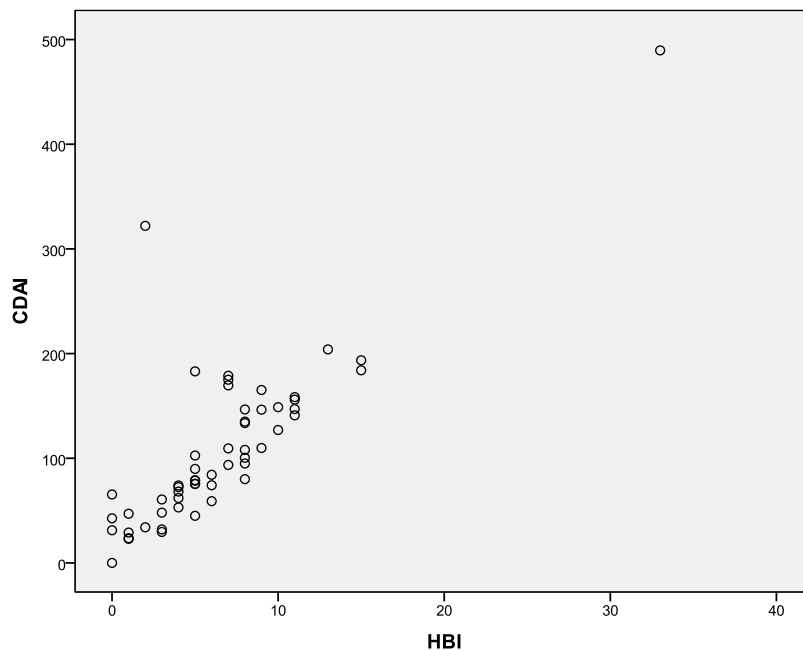


Abbildung 7: Korrelation des CDAI mit dem HBI. Zwischen den beiden Krankheitsaktivitäts-Indices für Morbus-Crohn-Patienten bestand eine Korrelation von $r=0,811$, auf dem Signifikanzniveau von 0,01 (nach Spearman-Rho).

3.2.5. Vergleich der Krankheitsaktivitätsindices mit den laborchemischen Parametern

Der Zusammenhang zwischen den Krankheitsaktivitätsindices und den laborchemischen Parametern wurde statistisch überprüft. Hierbei zeigte sich eine signifikante, aber nur mäßig ausgeprägte Korrelation des CDAI mit den Albumin-Konzentrationen nach Spearman-Rho ($r=0,413$, $p=0,002$).

Der HBI korrelierte schwach mit den CRP- ($r=0,331$, $p= 0,016$) und mit den Albumin-Konzentrationen ($r=0,325$, $p=0,017$).

	Albumin	CRP
CDAI - Korrelation nach Spearman-Rho		
Korrelationskoeffizient	0,413	0,258
Signifikanz	0,002	0,062
HBI - Korrelation nach Spearman-Rho		
Korrelationskoeffizient	0,325	0,331
Signifikanz	0,017	0,016

Tabelle 4: Darstellung der Korrelation des CDAI und des HBI mit den CRP- und Albuminkonzentrationen. Der CDAI korrelierte signifikant, aber moderat mit der Albumin-Konzentration, während der HBI signifikant, jedoch schwach mit den Albumin- und CRP-Konzentrationen korrelierte.

3.3. Auswertung der intrazellulären ATP-Konzentrationen in CD4⁺-T-Zellen

Für 98 Patienten wurde der intrazelluläre ATP-Wert der CD4-positiven Zellen mittels des Cylex[®]-ImmuKnow[®]-Assays ermittelt. Bei den 49 weiblichen Patienten lag der ATP-Mittelwert bei 672 ng/mL und der Median bei 639 ng/mL. Bei den 49 männlichen Patienten hingegen wurde ein ATP-Mittelwert von 632 ng/mL und ein Median von 598 ng/mL festgestellt. Die weiblichen Patienten hatten somit im Durchschnitt einen höheren ATP-Wert als die männlichen. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,316$, Mann-Whitney-U-Test).

Verglichen mit den von Kowalski et al. vorgelegten Referenzwerten der intrazellulären ATP-Konzentration in CD4⁺-Zellen waren die ATP-Konzentrationen der CED-Patienten in dieser

Studie vergleichsweise hoch (Batal et al. 2008; Kowalski et al. 2003; Kowalski et al. 2006). Die Mittelwerte bzw. Mediane der ATP-Konzentrationen lagen mit Konzentrationen über 525 ng/mL ATP im Bereich einer hohen Immunantwort. Es befanden sich 74 Patienten im Bereich einer hohen, 23 Patienten im Bereich einer moderaten und nur ein Patient im Bereich einer schwachen Immunantwort der CD4⁺-Zellen (siehe Abbildung 8).

Zwischen den beiden Erkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa gab es im Bezug auf die lymphozytären ATP-Wert-Mediane bzw. -Mittelwerte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,932$, Mann-Whitney-U-Test). Für die Morbus-Crohn-Patienten lag der Mittelwert bei 656 ng/mL und für die Colitis-ulcerosa-Patienten bei 648 ng/mL.

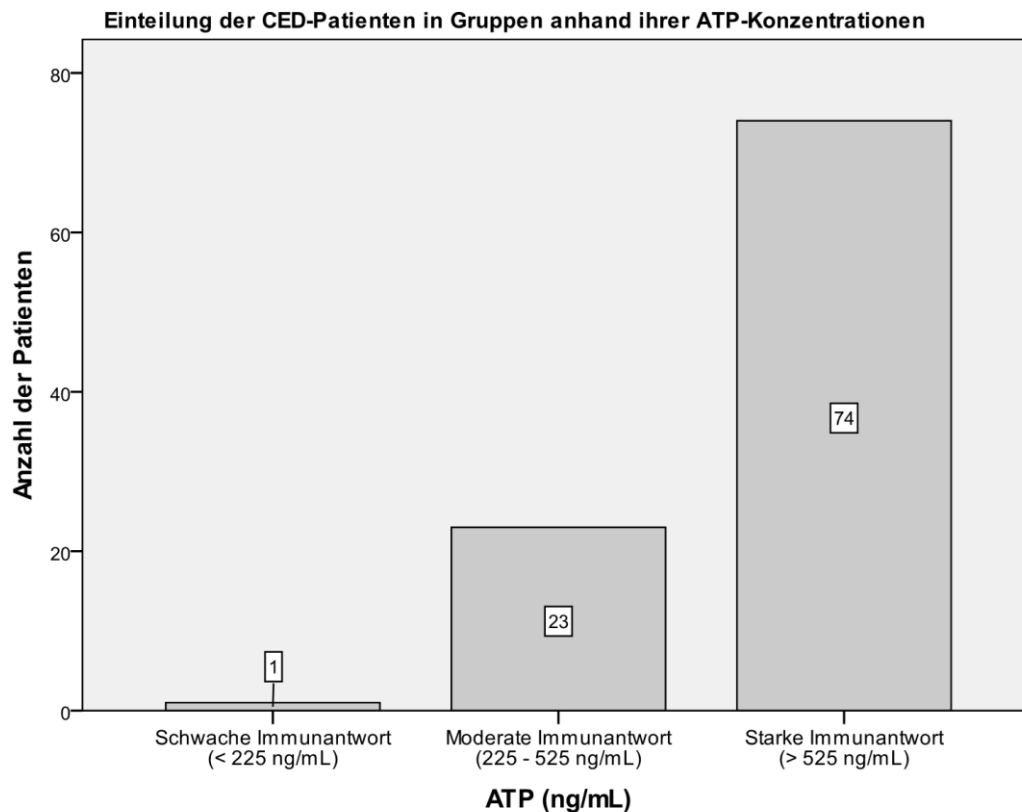


Abbildung 8: Darstellung der Anzahl an Patienten der verschiedenen Gruppen, die sich anhand ihrer intrazellulären ATP-Konzentrationen der CD4⁺-Zellen in einer schwachen, moderaten und starken Immunantwort unterschieden.

3.3.1. Korrelation der ATP-Konzentrationen mit den Krankheitsaktivitätsindices

Für die Beantwortung der Frage, ob sich die intrazellulären ATP-Konzentrationen von CD4-positiven Zellen zur Bestimmung der Krankheitsaktivität von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eignen, wurde eine Korrelationsanalyse mit den ermittelten ATP-Werten aus dem *Cylex®-ImmuKnow®-Assay* und den errechneten Krankheitsaktivitätsindices, dem CDAI und dem HBI der Morbus-Crohn-Patienten und dem SCCAI der Colitis-ulcerosa-Patienten, durchgeführt.

Es wurde keine Korrelation zwischen den ATP-Konzentrationen der CD4 positiven Lymphozyten und dem CDAI, dem HBI oder dem SCCAI festgestellt (CDAI: $r=0,005$, $p=0,979$; HBI: $r=-0,068$, $p=0,626$; SCCAI: $r=0,157$, $p=0,304$) (siehe Abbildung 9).

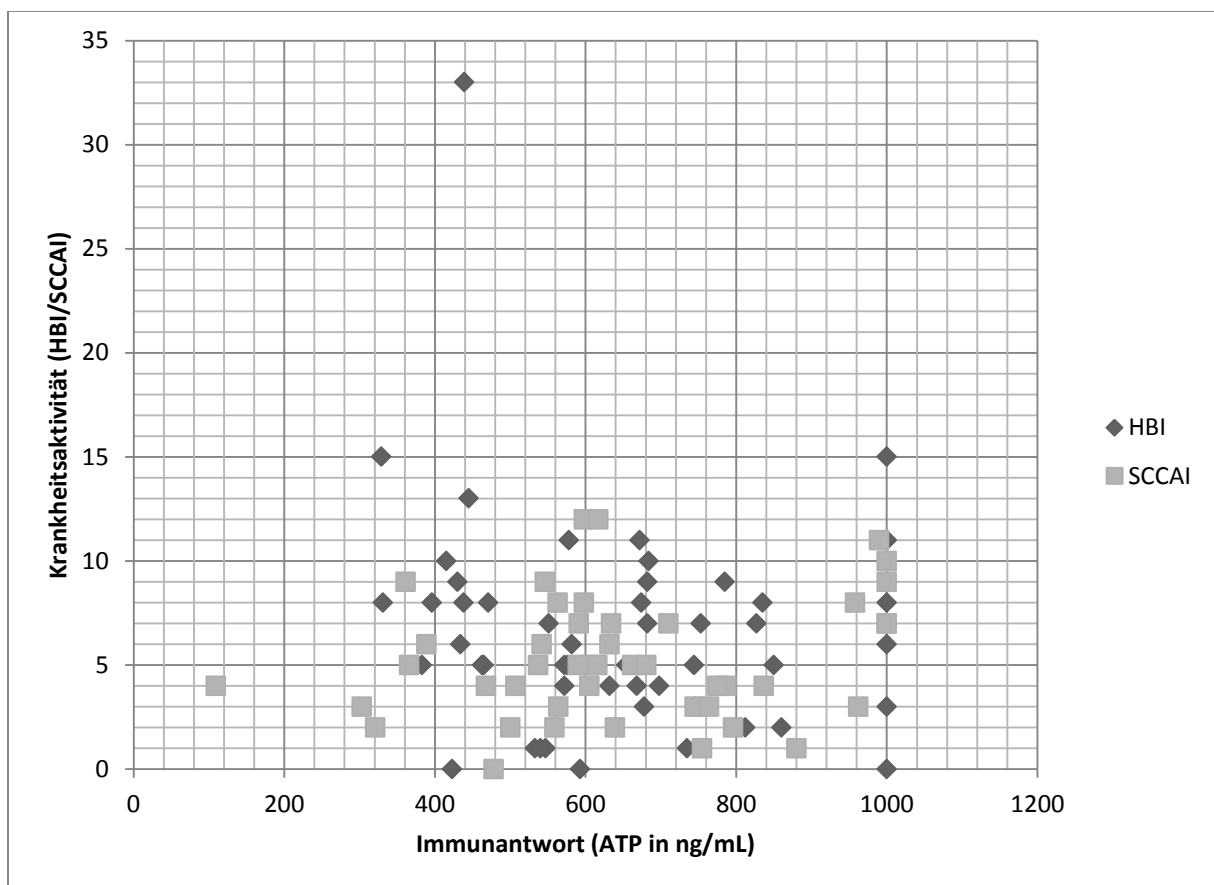


Abbildung 9: Darstellung der Immunantwort bzw. der intrazellulären ATP-Konzentrationen der CD4⁺-Lymphozyten in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität der Patienten (HBI, SCCAI).

Durch eine Einteilung der Morbus-Crohn-Patienten nach den Ergebnissen des HBI in Patienten, die sich in Remission und in Patienten, die sich in einem akuten Schub der Erkrankung befanden, konnten jedoch diskrete Unterschiede bezüglich der ATP-Mittelwerte bzw. -Mediane festgestellt werden. Der Mittelwert der 19 sich in Remission befindlichen Morbus-Crohn-Patienten lag bei 685 ng/mL (Median: 668 ng/mL) und der Mittelwert der 36 sich im akuten Schub der Erkrankung befindlichen MC-Patienten lag bei 643 ng/mL (Median: 618 ng/mL). Ein signifikanter Unterschied der Mediane wurde jedoch nicht festgestellt ($p=0,786$, Mann-Whitney-U-Test). Lediglich auffällig war eine größere Streuung der ATP-Konzentrationen der Morbus-Crohn-Patienten mit erhöhter Krankheitsaktivität (siehe Abb. 10).

Bei den Colitis-ulcerosa-Patienten stellte sich im Mann-Whitney-U-Test zwischen den Patienten in Remission und im akuten Schub der Erkrankung ebenfalls kein signifikanter Unterschied der ATP-Mediane heraus ($p=0,560$, Mann-Whitney-U). Bei den Remissions-Patienten lag der ATP-Mittelwert bei 617,7 ng/mL (Median: 622 ng/mL) und bei den Patienten im akuten Schub bei 671,44 ng/mL (Median: 616 ng/mL).

ATP-Werte	Gesamtes Patientenkollektiv			
Mittelwert	652 ng/mL			
Median	625 ng/mL			
Standardabweichung	203 ng/mL			
	Morbus Crohn		Colitis ulcerosa	
	Remission	Akuter Schub	Remission	Akuter Schub
Mittelwert	685 ng/mL	643 ng/mL	618 ng/mL	671 ng/mL
Median	668 ng/mL	618 ng/mL	622 ng/mL	616 ng/mL
Standardabweichung	161 ng/mL	216 ng/mL	217 ng/mL	203 ng/mL

Tabelle 5: Darstellung der Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der lymphozytären ATP-Konzentrationen der MC- und CU-Patienten, auch in Abhängigkeit von ihrer Krankheitsaktivität.

Nach einer Unterteilung der CED-Patienten anhand ihrer intrazellulären ATP-Konzentrationen in Patienten mit schwacher, moderater und starker Immunantwort, wurden auch diese mit den Krankheitsaktivitätsindices korreliert. Dabei stellte sich eine

schwache, jedoch negative Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität der Patienten nach dem HBI und den Gruppen der CD4⁺-Zell-Immunantwort heraus ($r=-0,295$, $p=0,05$, Spearman-Rho).

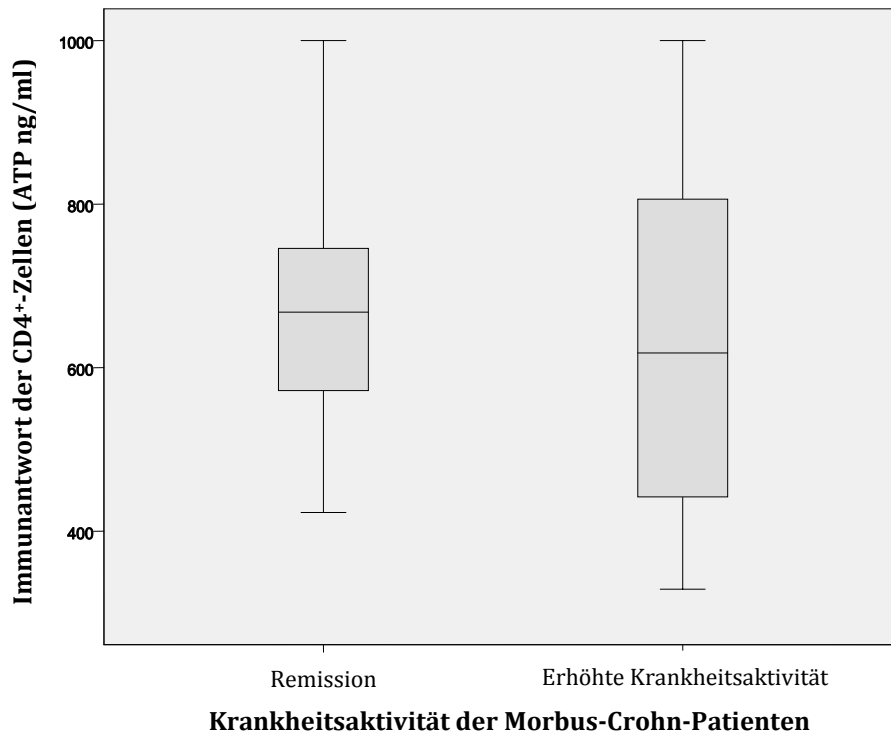


Abbildung 10: Boxplot-Darstellung der lymphozytären ATP-Konzentrationen der MC-Patienten in Remission und mit erhöhter Krankheitsaktivität. Die untere Begrenzung der jeweiligen Box stellt die 25er-Perzentile dar, während die mittlere Linie den Median und die obere Begrenzung die 75er-Perzentile angibt. Die *Whiskers* der einzelnen *Box-Plots* stellen die 10er- und 90er-Perzentile dar. Im Vergleich der MC-Patienten mit erhöhter Krankheitsaktivität und in Remission war kein signifikanter Unterschied der ATP-Konzentrationen nachweisbar.

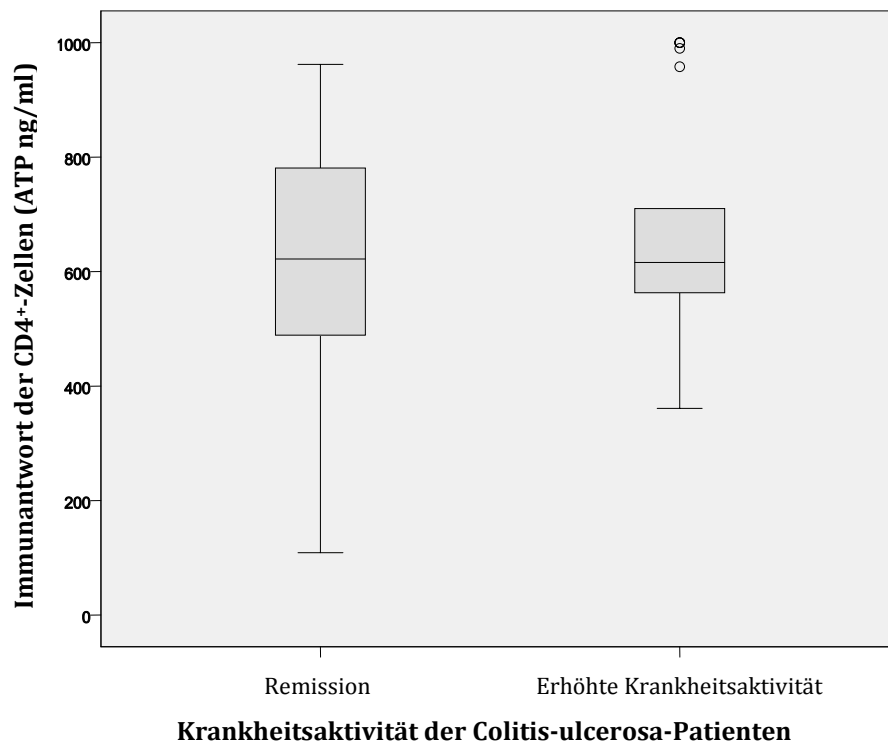


Abbildung 11: Boxplot-Darstellung der lymphozytären ATP-Werte der CU-Patienten in Remission und mit erhöhter Krankheitsaktivität. Im Vergleich der CU-Patienten mit erhöhter Krankheitsaktivität und in Remission, war kein signifikanter Unterschied der ATP-Konzentrationen nachweisbar.

3.3.2. Korrelation der ATP-Konzentrationen mit den CRP- und Albumin-Konzentrationen

Bei der Untersuchung auf einen möglichen Zusammenhang zwischen den intrazellulären ATP-Konzentrationen der Colitis-ulcerosa-Patienten und den CRP-Konzentrationen mittels Rangkorrelation nach Spearman-Rho wurde eine signifikante, aber moderate Korrelation zwischen den intrazellulären ATP-Konzentrationen der Colitis-ulcerosa-Patienten und den CRP-Konzentrationen ermittelt ($r=0,331$, $p=0,026$). Es wurde jedoch keine signifikante Korrelation der ATP-Konzentrationen mit den Albumin- oder den CRP-Konzentrationen der Morbus-Crohn-Patienten festgestellt.

3.3.3. Korrelation der intrazellulären ATP-Konzentrationen mit einer Glukokortikoid-Therapie

Der Median der ATP-Konzentrationen der 36 Patienten mit Glukokortikoid-Therapie lag bei 653 ng/mL, während der Median der ATP-Konzentrationen der 62 Patienten ohne Glukokortikoid-Therapie bei 611 ng/mL lag. Zwischen der Höhe des Medians der intrazellulären ATP-Konzentrationen der Patienten mit Glukokortikoid-Behandlung und der Patienten ohne Glukokortikoid-Behandlung war nach dem Mann-Whitney-U-Test aufgrund der hohen interindividuellen Variabilität der Konzentrationen kein signifikanter Unterschied nachweisbar. Die Signifikanz des U-Tests lag bei 0,058. Auffällig war eine schiefe Verteilung der ATP-Konzentrationen bei den Patienten unter Glukokortikoid-Therapie, mit einigen Ausreißer-Werten besonders hoher ATP-Konzentrationen (siehe Abb. 12).

Es zeigte sich jedoch eine signifikante Korrelation zwischen der Glukokortikoid-Therapie und dem SCCAI ($r=0,338$, Signifikanz: 0,023, Spearman-Rho) und der Glukokortikoid-Therapie und den Albuminwerten ($r=0,225$, Signifikanz: 0,026, Spearman-Rho) der Patienten.

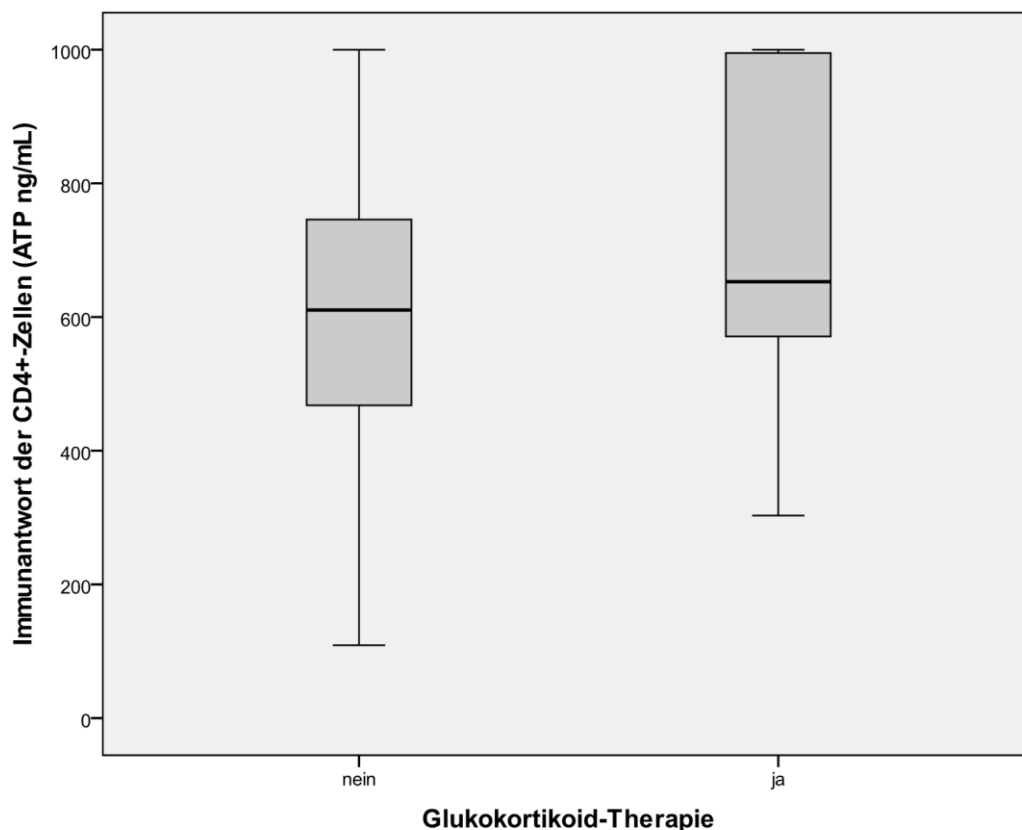


Abbildung 12: Darstellung der Mediane der ATP-Konzentrationen der Patienten mit und ohne Glukokortikoid-Therapie. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten unter Glukokortikoid-Therapie und den Patienten ohne eine solche Therapie nachweisbar.

3.3.4. Zusammenhang zwischen den ATP-Konzentrationen und einer Infliximab-Therapie

Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen den Medianen der intrazellulären ATP-Konzentrationen der CD4⁺-Lymphozyten der Patienten unter Infliximab-Therapie und der Patienten ohne Infliximab-Therapie festgestellt ($p < 0,01$, Mann-Whitney-U).

Der Mittelwert der lymphozytären ATP-Konzentrationen der 16 Patienten, die unter einer Infliximab-Therapie standen, lag bei 478,69 ng/mL (Median: 451,50 ng/mL), während sich die ATP-Konzentrationen der Patienten ohne Infliximab-Therapie im Mittel bei 686,06 ng/mL (Median: 667,00 ng/mL) befanden.

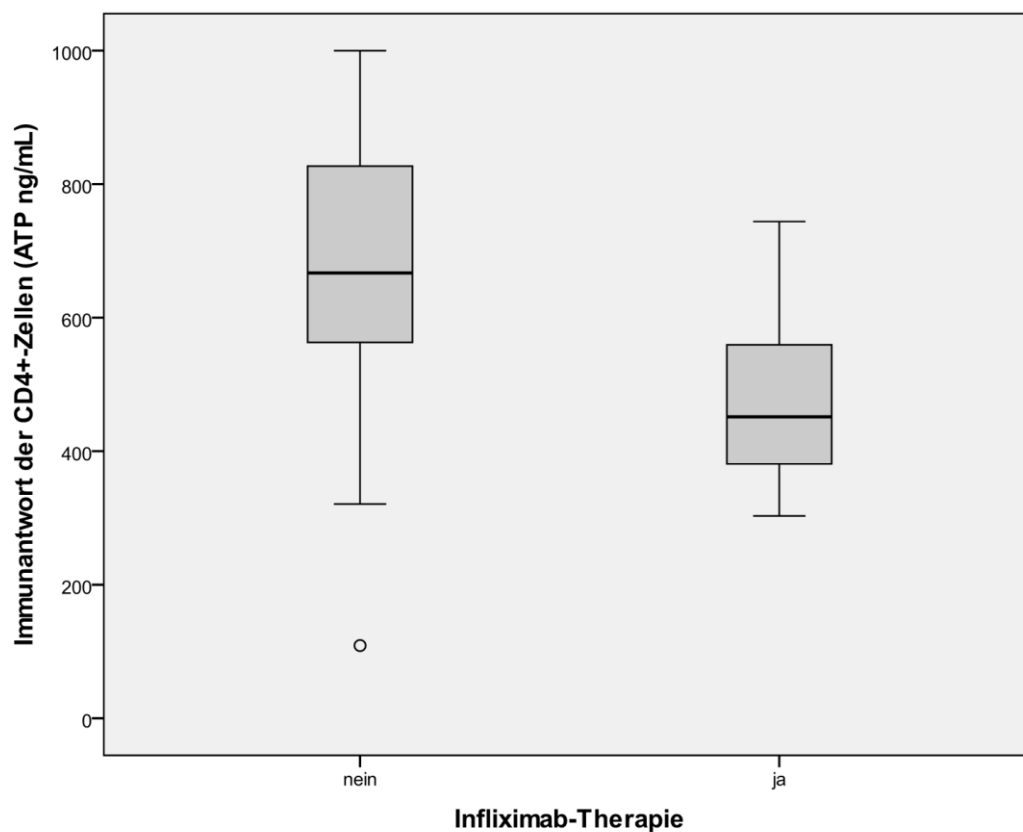


Abbildung 13: Darstellung der Mediane der ATP-Konzentrationen der Patienten mit und ohne Infliximab-Therapie. Im Durchschnitt waren die ATP-Werte der Patienten, die eine Infliximab-Therapie erhielten niedriger als die der Patienten ohne eine derartige Therapie. Dieser Unterschied war im Mann-Whitney-U-Test auf einem Niveau von unter 0,01 hochsignifikant.

3.4. Quantifizierung regulatorischer T-Zellen mittels der FACS-Analytik

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Anzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut der Patienten und ihrer Krankheitsaktivität.

Zur Untersuchung dieses Zusammenhangs wurde von 99 Patienten die Anzahl der regulatorischen T-Zellen vom Anteil der gesamten CD4-positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Hierzu wurden die regulatorischen T-Zellen anhand des Oberflächenmarkers CD4, der starken Expression des Oberflächenmarkers CD25 und dem intrazellulären Transkriptionsfaktor FoxP3, welcher als relativ spezifisch für diese Zellen gilt, identifiziert. Um zusätzlich die Genauigkeit der Identifizierung dieser T_{regs} zu erhöhen, wurden ausschließlich Zellen mit besonders geringer Ausprägung des Oberflächenmarkers CD127 quantifiziert. Der Anteil CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺CD127⁻-Zellen von der Gesamtheit der CD4-positiven Zellen gilt somit folgend synonym für die Anzahl regulatorischer T-Zellen.

Der Mittelwert der Anzahl der regulatorischen T-Zellen aus der FACS-Analytik aller Patientenproben lag bei 1,43. Im Mittel hatten die Patienten somit 1,43 % regulatorische T-Zellen im Verhältnis zu den gesamten CD4-positiven Zellen im peripheren Blut. Der Mittelwert der Anzahl der T_{regs} der männlichen Patienten lag bei 1,56 und der der weiblichen Patienten bei 1,30. Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Patienten festgestellt ($p=0,59$, Mann-Whitney-U-Test).

Der Mittelwert der T_{regs} der MC-Patienten lag bei 1,54 (Median bei 1,35), während der Mittelwert der CU-Patienten bei 1,29 (Median bei 1,20) lag (siehe Abb. 15). Dieser Unterschied zwischen den Morbus-Crohn- und den Colitis-ulcerosa-Patienten war jedoch im Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant ($p=0,249$).

Zur Untersuchung der klinischen Wertigkeit des Oberflächenmarkers CD127 wurde von 20 Patientenproben zusätzlich die Anzahl der regulatorischen T-Zellen ohne das CD127-Gate identifiziert. Dabei wurde ein Mittelwert der T_{reg}-Anzahl von 1,60 und ein Median von 1,45 mit einer Standardabweichung von 0,82 festgestellt.

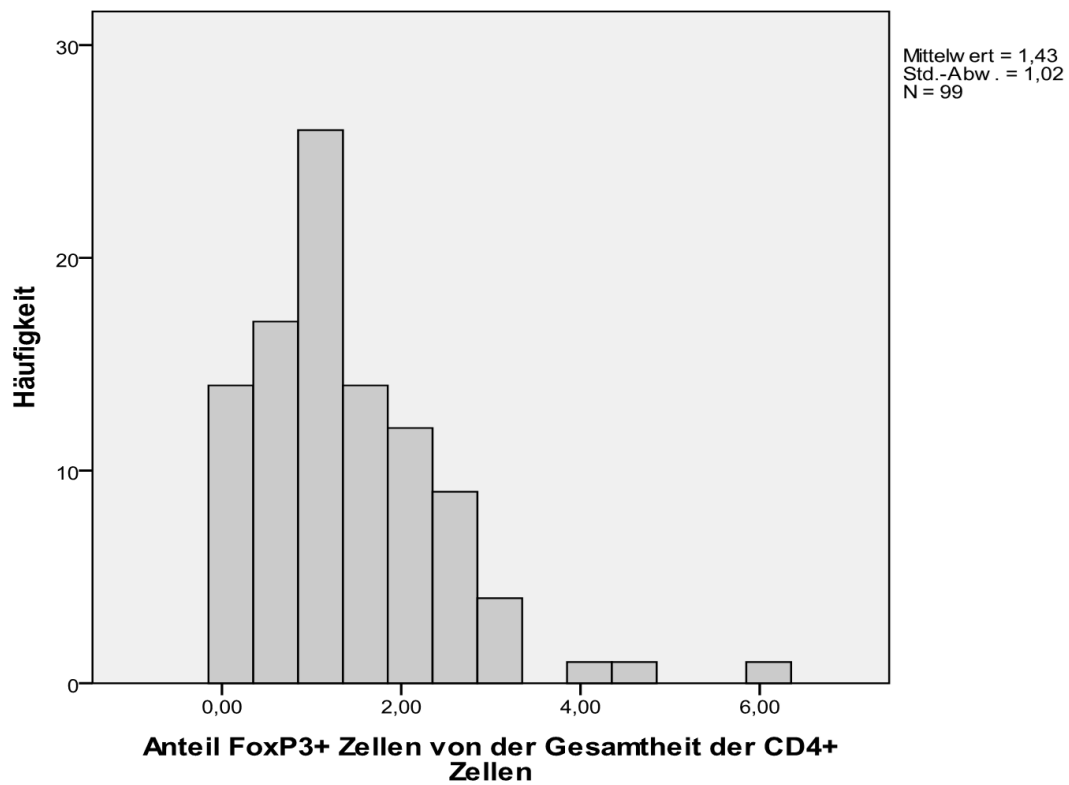


Abbildung 14: Darstellung der Häufigkeiten der prozentualen Anteile regulatorischer T-Zellen von der Gesamtheit der CD4-positiven Zellen. Der höchste Anteil regulatorischer T-Zellen eines Patienten lag bei 6 % und der niedrigste bei 0 %. Im Mittel besaßen die Patienten 1,43 % regulatorische T-Zellen.

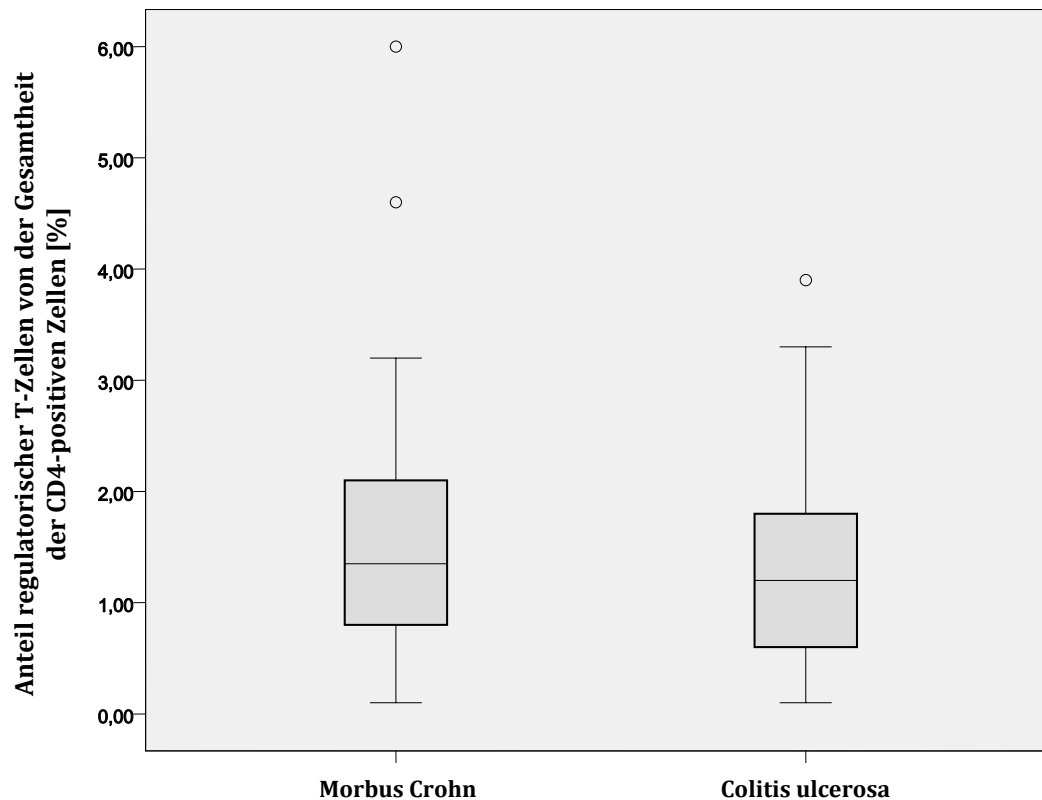


Abbildung 15: Boxplot-Darstellung der Anzahl regulatorischer T-Zellen der Morbus-Crohn- und der Colitis-ulcerosa-Patienten. Es war kein signifikanter Unterschied der Mediane zwischen den beiden Erkrankungen nachweisbar.

3.4.1. Korrelation der Anzahl regulatorischer T-Zellen mit den Krankheitsaktivitätsindices

Eines der primären Ziele dieser Studie war es, die Abhängigkeit der Krankheitsaktivität der Morbus-Crohn- oder Colitis-ulcerosa-Patienten von ihrer Anzahl an regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut zu untersuchen.

Die Krankheitsaktivitätsindices korrelierten nicht mit der in der FACS-Analytik ermittelten Anzahl regulatorischer T-Zellen der Patienten (FoxP3 und CDAI: $r=0,005$, $p=0,972$; FoxP3 und HBI: $r=-0,154$, $p=0,265$; FoxP3 und SCCAI: $r=-0,70$, $p=0,649$; nach Spearman). Die Anzahl der T_{regs} die ohne das CD127⁻-Gate quantifiziert wurde, korrelierte ebenfalls mit keinem der

Krankheitsaktivitätsindices (CDAI: $r=0,152$, $p=0,674$; HBI: $r=-0,031$, $p=0,933$; SCCAI: $r=0,201$, $p=0,577$; Spearman).

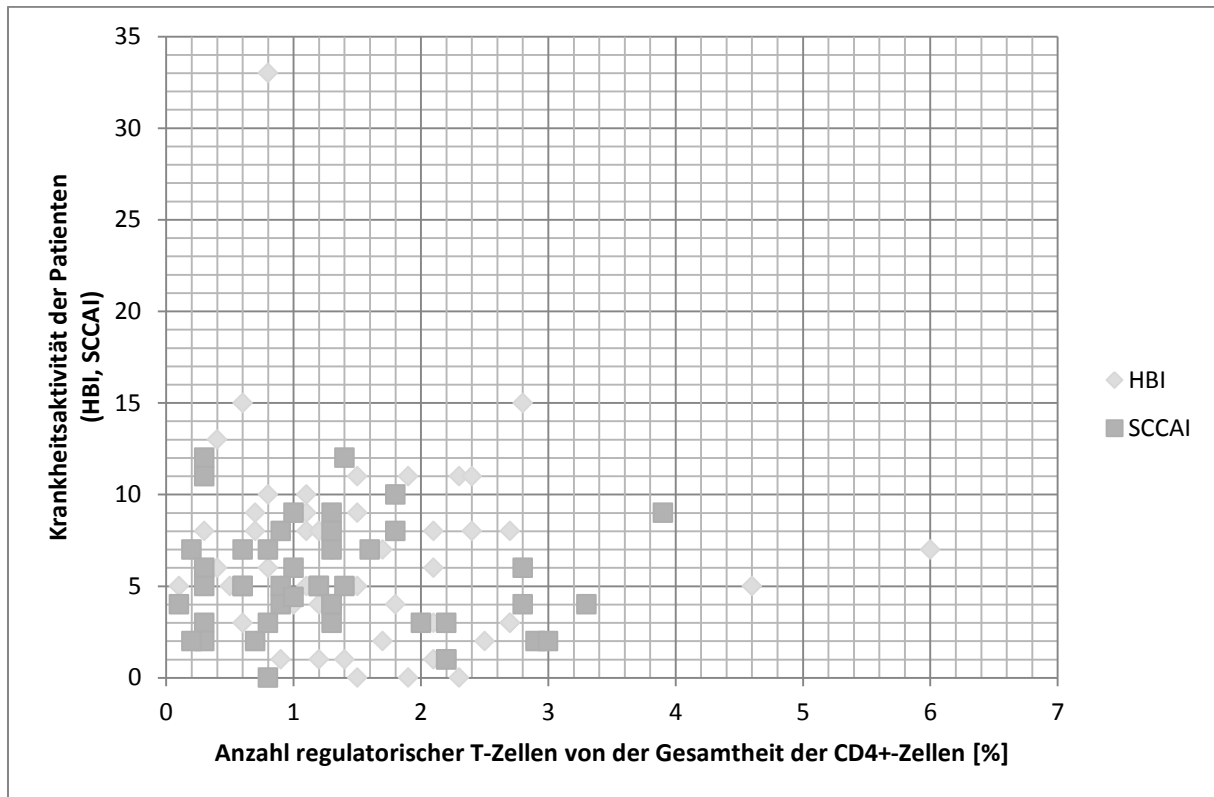


Abbildung 16: Darstellung der Anzahl regulatorischer T-Zellen in Abhängigkeit von der jeweiligen Krankheitsaktivität der Patienten. Es wurde keine signifikante Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität der Patienten und ihrer Anzahl an regulatorischen T-Zellen festgestellt. (FoxP3 und HBI: $r=-0,154$, $p=0,265$; FoxP3 und SCCAI: $r=-0,70$, $p=0,649$; nach Spearman)

Im Vergleich der Anzahl regulatorischer T-Zellen der Patienten mit erhöhter Krankheitsaktivität und Patienten in Remission wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt ($p=0,073$, Mann-Whitney-U-Test). Mit einer Signifikanz von $0,073$ des U-Tests war jedoch eine Tendenz zu einem Unterschied zwischen der Anzahl der regulatorischen T-Zellen der Patienten im akuten Schub und in Remission vorhanden. Tendenziell hatten die Patienten in Remission, sowohl beim Morbus Crohn als auch bei der Colitis ulcerosa, höhere FoxP3-Werte als die Patienten im akuten Schub.

FoxP3-FACS-Analytik (Tregs/CD4 ⁺ [%])	

Mittelwert	1,33	1,59		
Median	1,10	1,45		
Standardabweichung	1,07	0,92		
	Colitis ulcerosa	Morbus Crohn		
Mittelwert	1,30	1,54		
Median	1,20	1,35		
Standardabweichung	0,92	1,09		
	akuter Schub	Remission	akuter Schub	Remission
Mittelwert	1,15	1,48	1,46	1,72
Median	1,00	1,30	1,10	1,75
Standardabweichung	0,83	1,02	1,21	0,81

Tabelle 6: Darstellung der FoxP3-Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen, sowie der FoxP3-Mittelwerte, Mediane und -Standardabweichungen unterteilt nach dem Krankheitsaktivitätsstatus der CU- und MC-Patienten. Die FoxP3-Werte der Patienten in Remission waren im Durchschnitt höher als die der Patienten im akuten Schub. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

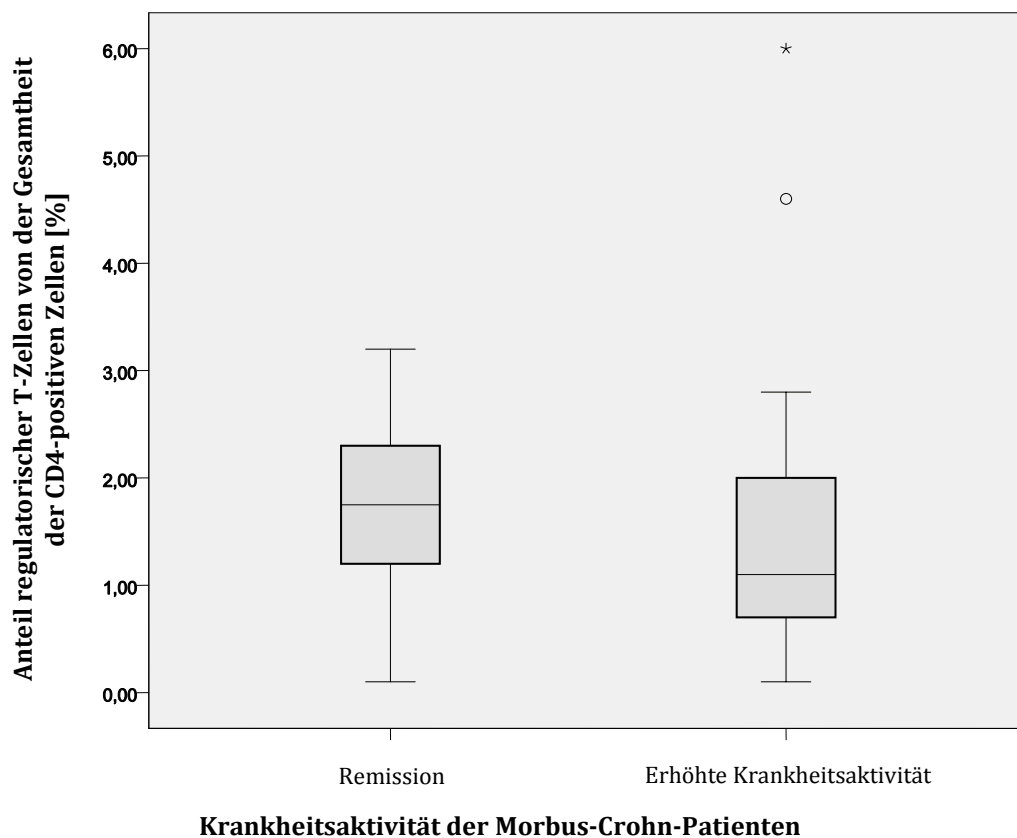
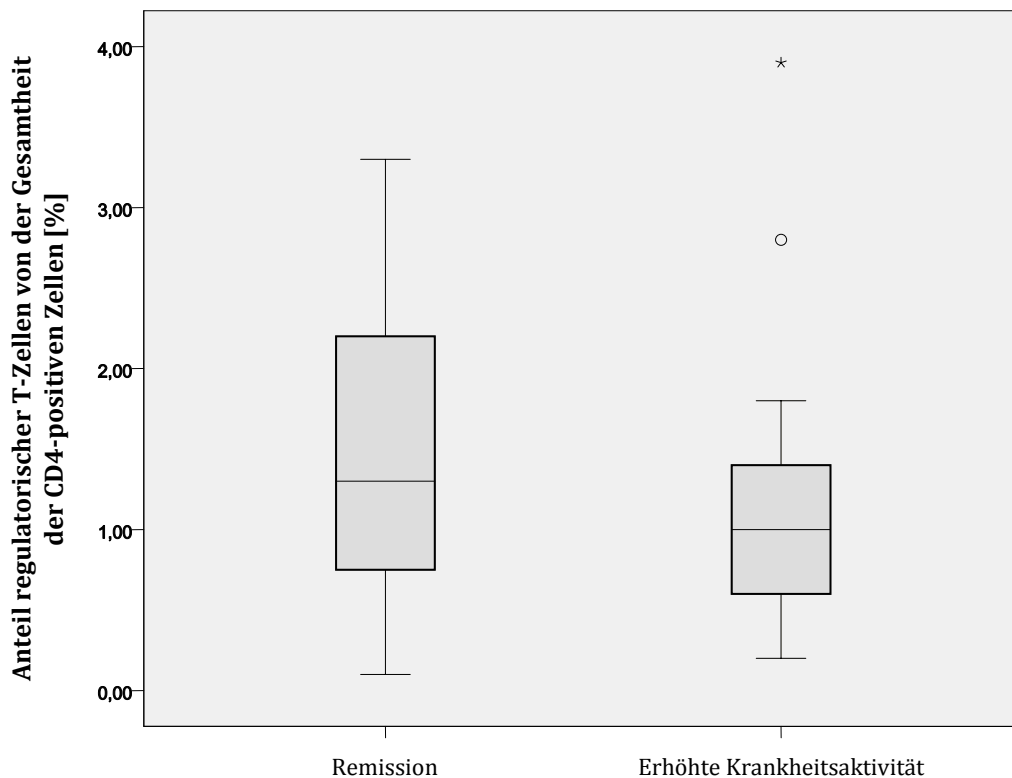


Abbildung 172: Boxplot-Darstellung der Unterschiede der FoxP3-Werte der Morbus-Crohn-Patienten in Remission und mit erhöhter Krankheitsaktivität.



Krankheitsaktivität der Colitis-ulcerosa-Patienten

Abbildung 38: Boxplot-Darstellung der Unterschiede der Anzahl regulatorischer T-Zellen der Colitis-ulcerosa-Patienten in Remission und mit erhöhter Krankheitsaktivität.

3.4.2. Einfluss von Medikamenten auf die Anzahl regulatorischer T-Zellen

Im Vergleich der Mediane der Anzahl regulatorischer T-Zellen der Patienten unter Glukokortikoid-Therapie und der Patienten ohne Glukokortikoid-Therapie, war zwischen ihnen ein geringer Unterschied vorhanden. So lag der Median der Patienten unter Prednisolon-Therapie bei 1,40 und der Median der Patienten ohne Prednisolon-Therapie bei 1,10. Dieser Unterschied war im Mann-Whitney-U-Test jedoch nicht signifikant ($p=0,209$). Der Median der Anzahl regulatorischer T-Zellen der Patienten unter Azathioprin-Therapie lag bei 1,20 und bei den Patienten ohne Azathioprin-Therapie bei 1,30. Der Median der Patienten die Mesalazin einnahmen lag bei 1,25 und bei denen die keines einnahmen bei 1,20. Auch

diese Unterschiede besaßen keine Signifikanz. Diese Mittelwerte und Mediane wurden auch in der unteren Tabelle veranschaulicht (siehe Tab. 7, Seite 57).

FoxP3-FACS-Analytik	Glukokortikoid-Th.		Azathioprin-Th.		Mesalazin-Th.	
	ja	nein	ja	nein	ja	nein
FoxP3-Mittelwert	1,55	1,37	1,50	1,39	1,34	1,49
FoxP3-Median	1,40	1,10	1,20	1,30	1,25	1,20
Foxp3-Standardabweichung	1,01	1,03	1,17	0,91	0,84	1,12

Tabelle 7: (Tregs/CD4+ [%]) Darstellung der FoxP3-Mittelwerte, -Mediane, -Standardabweichungen in Abhängigkeit von einer Glukokortikoid-Th., einer Azathioprin-Th. und einer Mesalazin-Th.

3.5. Quantifizierung regulatorischer T-Zellen mithilfe eines FoxP3-spezifischen DNA-Methylierungsassays

Im Zuge dieser Arbeit wurde außerdem untersucht, inwieweit sich die Anzahl regulatorischer T-Zellen, gemessen mit der FACS-Analytik, mit jener aus dem DNA-Methylierungsassay vergleichen lässt und welche Unterschiede im Hinblick auf die klinische Wertigkeit vorhanden sind.

Zu diesem Zweck wurde aus den Proben von 35 Patienten zusätzlich zur FACS-Analytik ein DNA-Methylierungsassay zur Quantifizierung der regulatorischen T-Zellen der Patienten durchgeführt. Diese 35 Patienten setzten sich aus 17 männlichen und 18 weiblichen Patienten zusammen.

Die Anzahl der regulatorischen T-Zellen wurde mithilfe des DNA-Methylierungsassays aus der Anzahl der demethylierten TSDR-Regionen errechnet. Der Mittelwert der Anzahl regulatorischer T-Zellen aus dem DNA-Methylierungsassay lag bei 1,11 und der Median bei 1,01. Bei den weiblichen Patienten lag der Mittelwert mit 1,00 (Median: 0,84) unter dem der männlichen Patienten mit 1,16 (Median: 1,13).

Im Vergleich der gemessenen Anzahl regulatorischer T-Zellen von 17 Colitis-ulcerosa-Patienten mit der von 18 Morbus-Crohn-Patienten war kein signifikanter Unterschied

erkennbar ($p=0,73$, Mann-Whitney-U-Test). Der Mittelwert der CU-Patienten lag bei 1,10 (Median: 0,96) und der Mittelwert der MC-Patienten bei 1,06 (Median: 1,01).

3.5.1. Vergleich der FoxP3-Werte aus dem DNA-Methylierungs-Assay mit den Krankheitsaktivitätsindizes

Die Anzahl der regulatorischen T-Zellen korrelierten weder mit dem CDAI, dem HBI, noch mit dem SCCAI der Patienten (FoxP3 und CDAI: $r=0,69$, $p=0,79$; FoxP3 und HBI: $r=0,24$, $p=0,33$; FoxP3 und SCCAI: $r=0,13$, $p=0,61$; Spearman) (siehe Abbildung 19).

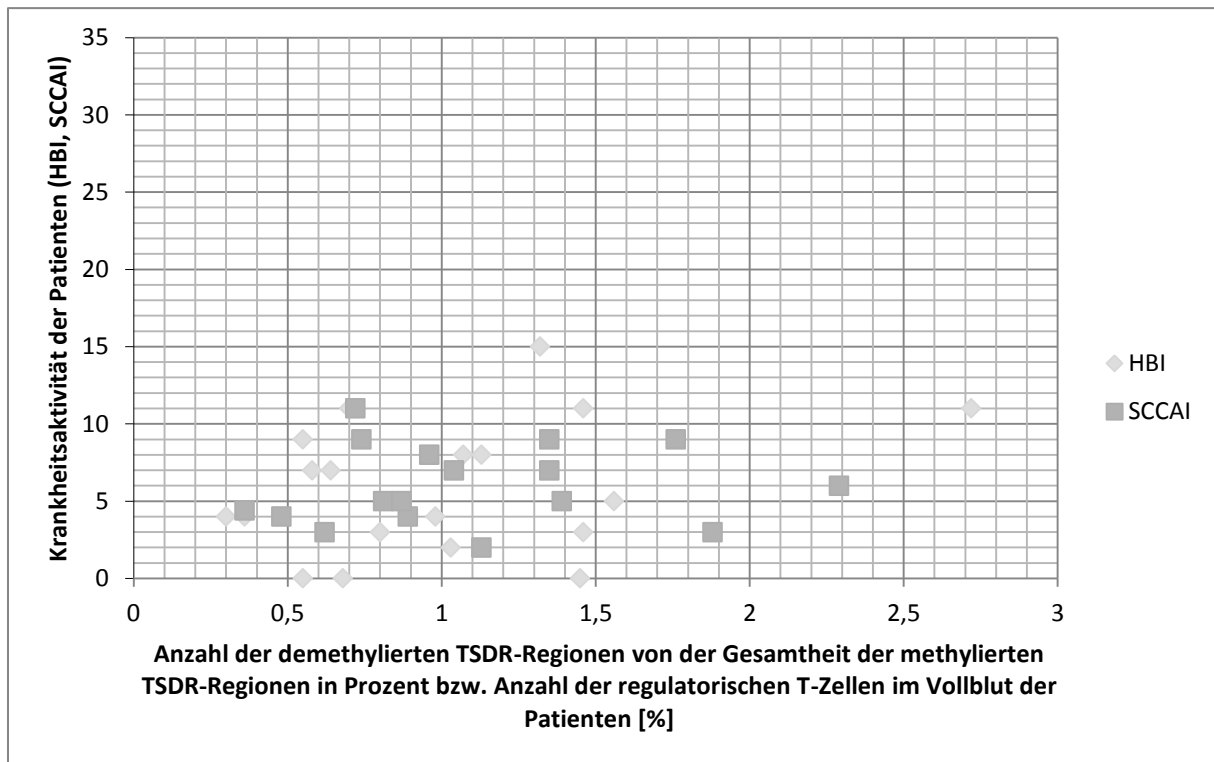


Abbildung 19: Darstellung der Anzahl regulatorischer T-Zellen (quantifiziert mittels des DNA-Methylierungsassays) in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität der Patienten. Es wurde keine signifikante Korrelation festgestellt (FoxP3 und HBI: $r=0,24$, $p=0,33$; FoxP3 und SCCAI: $r=0,13$, $p=0,61$; Spearman).

Bei einer Unterteilung der Patienten in jene, die sich in Remission und in jene, die sich im akuten Schub der Erkrankung befanden, stellten sich jedoch im Vergleich dieser beiden Gruppen ein Unterschied der Mediane der Anzahl regulatorischer T-Zellen heraus. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant ($p=0,117$, Mann-Whitney-U-Test). Interessanterweise war die Anzahl regulatorischer T-Zellen, gemessen mit dem DNA-

Methylierungs-Assay, gegensätzlich zu der Anzahl der T_{regs} aus der FACS-Analytik verteilt. Denn nach dem DNA-Methylierungsassay war die Anzahl der T_{regs} der Patienten in Remission durchschnittlich niedriger als die T_{reg} -Anzahl der Patienten im akuten Schub der jeweiligen Erkrankung.

So lag der Mittelwert der Anzahl regulatorischer T-Zellen der Remissions-Patienten bei 0,90, der Median bei 0,85 und die Standardabweichung bei 0,46, während der Mittelwert der Patienten im akuten Schub bei 1,19, der Median bei 1,07 und die Standardabweichung bei 0,56 lag. Der Unterschied war im Mann-Whitney-U-Test allerdings nicht signifikant ($p=0,117$)

FoxP3-DNA-Methylierungs-Assay: Anteil der Zellen mit demethylierter TSDR-Region von den Zellen mit methylierter TSDR-Region im Vollblut der Patienten bzw. Anteil T_{regs} im Vollblut				
	Remission		Akuter Schub	
FoxP3-Mittelwert	0,90		1,19	
FoxP3-Median	0,85		1,07	
FoxP3-Standardabweichung	0,46		0,56	
	Morbus Crohn		Colitis ulcerosa	
FoxP3-Mittelwert	1,05		1,10	
FoxP3-Median	1,01		0,96	
FoxP3-Standardabweichung	0,56		0,52	
	Remission	Schub	Remission	Schub
FoxP3-Mittelwert	0,91	1,17	0,89	1,21
FoxP3-Median	0,89	1,10	0,76	1,04
FoxP3-Standardabweichung	0,41	0,66	0,56	0,49

Tabelle 8: FoxP3-Mittelwerte, -Mediane und -Standardabweichungen der Patienten in Remission und im akuten Schub der Erkrankungen, der MC- und CU-Patienten und zusätzlich der MC- und CU-Patienten in Abhängigkeit von ihrer Krankheitsaktivität.

3.5.2. Zusammenhang zwischen der Anzahl regulatorischer T-Zellen aus dem DNA-Methylierungs-Assay und der Prednisolon-Therapie

Bei dem Vergleich der Anzahl regulatorischer T-Zellen des DNA-Methylierungs-Assay von den Patienten unter Prednisolon-Therapie mit den Patienten ohne Prednisolon-Therapie wurde ein Unterschied festgestellt. Der Mittelwert der Patienten unter Prednisolon-Therapie lag bei 0,85, während der Mittelwert von den Patienten ohne Prednisolon-Therapie bei 1,21 lag. Der Unterschied war im statistischen Test signifikant ($p=0,044$, Mann-Whitney-U-Test).

3.6. Vergleich der Anzahl regulatorischer T-Zellen aus der FACS-Analytik mit der aus dem DNA-Methylierungsassay

Zur Untersuchung, ob beide Methoden zur Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen des peripheren Blutes die gleiche Aussage treffen oder inwieweit sie sich in ihrer Aussage unterscheiden, wurden beide Methoden miteinander verglichen.

Es wurde keine signifikante Korrelation zwischen den Ergebnissen beider Methoden festgestellt ($r=0,073$, $p=0,676$, Pearson). Die Mittelwerte und Mediane der Anzahl regulatorischer T-Zellen des DNA-Methylierungsassays waren im Durchschnitt niedriger als diejenigen aus der FACS-Analytik.

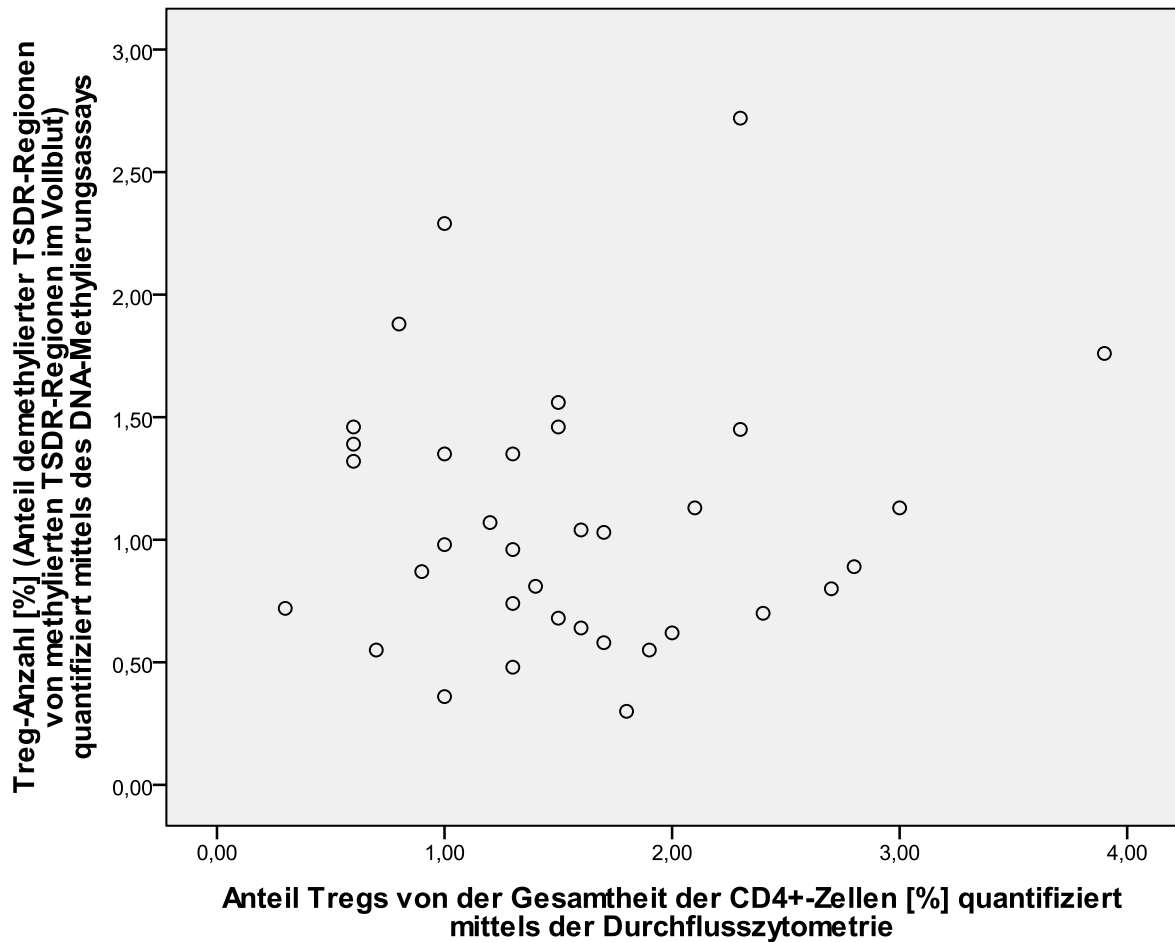


Abbildung 20: Scatterplot-Darstellung des prozentualen Anteils regulatorischer T-Zellen von der Gesamtheit der CD4-positiven Zellen aus der FACS-Analytik und dem prozentualen Anteil der Tregs im Vollblut der Patienten aus dem DNA-Methylierungsassay. Auf der X-Achse sind die Tregs aufgetragen, die mit der FACS-Analytik quantifiziert wurden und auf der Y-Achse die regulatorischen T-Zellen, die mithilfe des DNA-Methylierungsassays bestimmt wurden.

4. Diskussion

4.1. Die intrazelluläre ATP-Konzentration von CD4⁺-T-Zellen als immunologischer Marker der Krankheitsaktivität chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen

Es existieren derzeit keine adäquaten Biomarker zur Prognose oder Rezidiv-Vorhersage von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Mithilfe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Einzelmessungen der ATP-Konzentrationen in CD4⁺-Lymphozyten nicht in der Lage sind, als Surrogatparameter die Krankheitsaktivität von Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa widerzuspiegeln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine Korrelation zwischen der Immunantwort in CD4⁺-Zellen, gemessen an ihrer intrazellulären ATP-Konzentration, und der Krankheitsaktivität der Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, festgestellt.

Für diesen Befund gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen unterliegt die iATP-Konzentration der CD4⁺-Lymphozyten einer großen interindividuellen Variabilität. So wiesen einige Patienten mit einer niedrigen Krankheitsaktivität im HBI oder SCCAI hohe ATP-Konzentrationen, aber auch einige erniedrigte ATP-Konzentrationen auf. Die intrazelluläre ATP-Konzentration in CD4-positiven Lymphozyten scheint somit einen sehr individuell unterschiedlichen Marker der Immunantwort darzustellen. Diese Annahme führt zu der Frage, ob die intrazellulären ATP-Konzentrationen in CD4⁺-Zellen jedoch im Sinne eines Verlaufsparameters für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen von Nutzen sein könnten. In weiterführenden Studien bliebe es zu untersuchen, ob es möglich ist, mithilfe des *Cylex*[®]-*ImmuKnow*[®]-Assays im Zuge einer longitudinalen Überwachung der lymphozytären ATP-Konzentrationen, das individuelle Krankheitsrezidiv-Risiko der Patienten abzuschätzen. Auch die Ergebnisse aus Untersuchungen bei Transplantationspatienten deuten interindividuelle Unterschiede der Immunantwort der CD4⁺-Lymphozyten an. So zeigte sich in einer Studie mit Nierentransplantationspatienten, dass sich aus Einzelmessungen der intrazellulären ATP-Konzentration keine Rückschlüsse auf das Infektions- oder Organabstoßungsrisiko der Patienten ziehen lassen (Huskey et al. 2011), während in anderen Studien mithilfe eines longitudinalen Monitorings der iATP-

Konzentrationen der CD4⁺-Zellen dies sehr wohl möglich war (Cadillo-Chavez et al. 2006; Sanchez-Velasco et al. 2008; Xue et al. 2010; Zeevi et al. 2005). In einer Metaanalyse von 2006 konnte anhand von 504 Organtransplantationspatienten, unter denen 39 Patienten eine Abstoßungsreaktion und 66 Patienten eine Infektion entwickelten, gezeigt werden, dass die ATP-Konzentration von CD4⁺-Lymphozyten einerseits mit dem Organabstoßung-Risiko und andererseits invers mit dem Infektionsrisiko der Patienten korrelierte (Kowalski et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnte nach der Unterteilung der Patienten anhand ihrer ATP-Konzentration in Gruppen mit schwacher, moderater und starker Immunantwort eine negative Korrelation dieser Gruppen mit dem Krankheitsaktivitätsindex HBI ermittelt werden. Obschon diese Korrelation nur sehr schwach ausgeprägt war, passte sie nicht in das Bild bei dem eine erhöhte Immunantwort der CD4⁺-Lymphozyten mit einer erhöhten Krankheitsaktivität der Patienten einhergehen sollte und verdeutlicht weiter, dass Einzelmessungen der iATP-Konzentration CD4⁺-Lymphozyten für die Einschätzung der Krankheitsaktivität von CED-Patienten weitgehend ungeeignet zu sein scheinen.

Eine weitere Ursache dafür, dass keine positive Korrelation zwischen den Krankheitsaktivitätsindices der Patienten und ihren ATP-Konzentrationen nachweisbar war, könnte darin liegen, dass in dem Patientenkollektiv die Mehrzahl der Patienten medikamentös adäquat eingestellt war. Es befanden sich somit viele Patienten in einer ähnlich niedrigen Krankheitsaktivitätsstufe, was eine Limitation der Studie darstellte. Um diese geringen Unterschiede in der Immunantwort der Patienten mit einer Signifikanz darzustellen, würde wahrscheinlich eine erheblich größere Probandenanzahl benötigt werden. Diese Problematik kam auch in der patienteneigenen Einschätzung zum Allgemeinbefinden zum Ausdruck, denn keiner der Patienten befand sich demnach in einem sehr schlechten oder unerträglichen gesundheitlichen Zustand. Am häufigsten wurde lediglich eine leichte Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens angegeben.

Für zukünftige Studien wären Verlaufskontrollwerte der intrazellulären ATP-Konzentrationen über einen längeren Zeitraum von Interesse, um bei den Patienten, deren Zustand sich deutlich ändert einen Unterschied bezüglich der ATP-Konzentrationen feststellen zu können. Zudem könnte in longitudinalen Studien beobachtet werden, wie sich die intrazelluläre ATP-Konzentration der Lymphozyten nach der Einnahme von bestimmten Medikamenten wie Glukokortikoid- oder Azathioprin-Präparaten verhält.

Die ATP-Konzentrationen der CED-Patienten lagen mit Konzentrationen der weiblichen Patienten im Median bei 639 ng/mL und Konzentrationen der männlichen Patienten im Median bei 598 ng/mL generell in einem hohen Bereich. Verglichen mit dem Referenzkollektiv von Kowalski et al. verfügten die Patienten im Durchschnitt mit einer intrazellulären ATP-Konzentration von über 525 ng/mL über eine starke Immunantwort (Batal et al. 2008; Kowalski et al. 2003; Kowalski et al. 2006). So besaßen in dieser Studie 75 % der Patienten eine starke Immunantwort, gemessen an ihrer intrazellulären ATP-Konzentration. Im Vergleich mit immunsupprimierten Transplantationspatienten hatten die Patienten dieser Studie wahrscheinlich aufgrund der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung ein besonders aktives Immunsystem und damit verbunden eine besonders ausgeprägte CD4⁺-Zell-vermittelte Immunantwort.

Der Unterschied zwischen den hohen ATP-Konzentrationen in dieser Studie und den niedrigen ATP-Konzentrationen bei Transplantations-Patienten könnte auch darin zu suchen sein, dass Transplantationspatienten einer besonders stark immunsuppressiven Therapie mit Medikamenten wie Tacrolimus und Ciclosporin unterzogen werden, während die CED-Patienten in der Regel mit mildereren Immunsuppressiva wie Azathioprin und dessen Derivaten oder Glukokortikoiden therapiert wurden.

Ein weiterer Grund für die fehlende positive Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität der CED-Patienten und ihrer CD4⁺-Immunantwort könnte auch darin begründet liegen, dass chronisch-entzündliche Darmerkrankungen durch viele verschiedene Veränderungen des Immunsystems charakterisiert sind und sich somit die Krankheitsaktivität nicht allein anhand der Aktivität der CD4⁺-Zellen ermitteln lässt. Bei der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankung scheint ein Unterschied in der Aktivität und Quantität der einzelnen CD4⁺-Zellen vorhanden zu sein. So besteht beim Morbus Crohn eine erhöhte T_H1-Lymphozyten-Aktivität, während bei der Colitis ulcerosa vor allem die Aktivität und Proliferation der T_H2-Lymphozyten erhöht ist (Bamias et al. 2003; Cho 2008; Strober et al. 2007). Des Weiteren spielen nach neueren Erkenntnissen die T_H17-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Monteleone et al. 2009). Die Messung der Immunantwort der gesamten CD4⁺-Zellpopulation könnte somit zu unspezifisch sein, da anscheinend die Unterschiede zwischen den einzelnen CD4⁺-Zellpopulationen von größerer Bedeutung sind als bisher angenommen. Ein Assay zur Messung der Krankheitsaktivität von Morbus-Crohn-Patienten müsste somit zum Beispiel die Immunantwort der T_H1-Zellen

erfassen und nicht die der gesamten CD4⁺-Zellen. Man könnte zu diesem Zweck auch die Unterschiede im Zytokinmilieu der einzelnen Zellpopulation ermitteln.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Einzelmessungen der intrazellulären ATP-Konzentrationen CD4-positiver T-Zellen sich nicht als immunologische Marker der Krankheitsaktivität chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen eignen. Sie können weder einen Unterschied zwischen den Krankheiten Morbus Crohn und Colitis ulcerosa anzeigen, noch sind sie in der Lage, die Krankheitsaktivität der Patienten widerzuspiegeln.

Für weiterführende Studien wäre es von Bedeutung zu untersuchen, ob sich die ATP-Konzentrationen von CD4⁺-Zellen als individuelle Marker des Immunsystems bei CED-Patienten eignen. Hierzu sollte die ATP-Konzentration der CD4⁺-Zellen über einen längeren Zeitraum wiederholt gemessen und bewertet werden.

4.1.1. Die Abhängigkeit der Immunantwort von CD4⁺-Zellen von Glukokortikoiden und Infliximab

Im Verlauf dieser Studie hat sich gezeigt, dass die intrazellulären ATP-Konzentrationen in Lymphozyten der Patienten, die unter Glukokortikoid-Therapie standen, höher waren als die der Patienten ohne eine derartige Therapie. In weiteren vor allem longitudinalen Studien wäre es nun von Interesse zu erforschen, ob die Glukokortikoid-Therapie einen direkten Einfluss auf die ATP-Konzentration der CD4⁺-Zellen hat oder ob die Ursache darin liegt, dass die Patienten mit schwereren Krankheitsverläufen und einer erhöhten Immunantwort häufiger systemische Glukokortikoide erhalten. Die Ergebnisse einer Studie mit Nierentransplantationspatienten in China, bei denen im Vergleich zu Kontrollpatienten die Glukokortikoidgabe nach der Transplantation schnell reduziert wurde, legen nahe, dass Glukokortikoide keinen entscheidenden direkten Einfluss auf die intrazelluläre ATP-Konzentration von CD4⁺-Zellen zu haben scheinen (Li et al. 2011). Dies sollte jedoch in weiteren Studien überprüft werden.

Eine Infliximab-Therapie hingegen scheint einen direkten Einfluss auf die Immunantwort der CD4⁺-Zellen zu haben. Es wurde ein hoch signifikanter Unterschied der lymphozytären ATP-Konzentrationen im Vergleich zwischen den Patienten mit und ohne Infliximab-Therapie festgestellt ($p < 0,01$, Mann-Whitney-U). Die Patienten unter Infliximab-Therapie hatten durchschnittlich eine niedrigere ATP-vermittelte Immunantwort der CD4⁺-Lymphozyten.

Infliximab gehört zu den sogenannten TNF- α -Blockern und wird unter anderem bei therapieresistenten Fällen von CED zur Inhibition von TNF- α getriggerten Entzündungsreaktionen verwendet. Der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches u. a. im Zusammenhang mit akuten und chronischen Entzündungsreaktionen, aber auch z.B. mit der Induktion der Apoptose in Tumorzellen, gesehen wird (Ksontini et al. 1998). TNF- α und weitere Moleküle der TNF-Familie, so wie z.B. TL1A (*TNF-like molecule 1A*), sind als Kostimulatoren an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt (Crawford und Wherry 2009; Croft 2003; Leitner et al. 2010; Watts 2005). So kann die signifikant geringere lymphozytäre Immunantwort der Patienten unter Infliximab-Therapie mit der Fehlenden Kostimulation der T-Lymphozyten begründet werden. Der TNF- α -Blocker Infliximab blockiert also ein kostimulatorisches Zytokin der T-Zell-Aktivierung und verhindert damit zumindest teilweise die Immunantwort dieser CD4⁺-Zellen, welche mithilfe der intrazellulären ATP-Konzentration gemessen wurde. Dieses Ergebnis stimmt auch mit dem einer anderen Studie überein, bei der herausgefunden wurde, dass TNF- α -Blocker die T-Zell-Apoptose induzieren, die T-Zell-Aktivierung inhibieren und die T-Zell-Zytokin-Ausschüttung reduzieren (Werner et al. 2011).

In weiteren Studien sollte überprüft werden, ob auch mit einer höheren Fallzahl die durchschnittliche intrazelluläre ATP-Konzentration der CD4⁺-Zellen von Patienten unter Infliximab-Therapie erniedrigt ist. Wenn sich die Ergebnisse bestätigen, wäre mit dem *Cyflex®-ImmuKnow®-Assays* evtl. ein Werkzeug vorhanden, mit dem sich die Effektivität einer Immunsuppression durch eine Infliximab-Behandlung bei CED-Patienten objektivieren lässt.

4.2. Die Anzahl regulatorischer T-Lymphozyten als immunologischer Marker der Krankheitsaktivität von CED-Patienten

4.2.1. Die Quantifizierung regulatorischer T-Lymphozyten mittels der Durchflusszytometrie

Die Anzahl der regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut der CED-Patienten, gemessen mittels der FACS-Analytik, korrelierte nicht mit der Krankheitsaktivität der Patienten. Nach Unterteilung der Patienten anhand der Krankheitsaktivitätsindices in Patienten mit erhöhter Krankheitsaktivität und in Patienten in Remission, konnte zwischen diesen Gruppen jedoch ein diskreter Unterschied bezüglich der T_{reg} -Anzahl ermittelt werden. Dieser Unterschied war im Mann-Whitney-U-Test mit einer Signifikanz von 0,073 jedoch nicht signifikant. Bei einer größeren Probandenanzahl und einem etwas veränderten Studiendesign, evtl. mit Patienten mit einer größeren Spannbreite von Krankheitsaktivitätszuständen, wäre möglicherweise ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der regulatorischen T-Zellen zwischen Patienten mit niedriger und erhöhter Krankheitsaktivität festgestellt worden. Allerdings zeigt die fehlende Signifikanz in der Korrelation zwischen der Anzahl der durchflusszytometrisch quantifizierten, regulatorischen T-Zellen und den Krankheitsaktivitätsindices, dass sich Einzelbestimmungen von regulatorischen T-Zellen vermutlich nicht zur Bestimmung des Immunstatus von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eignen.

In Studien von Takahashi M. et al. wurde 2006 eine moderate, inverse Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität von Colitis-ulcerosa-Patienten und der Anzahl ihrer regulatorischen T-Zellen aufgezeigt. Eine Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und der Anzahl von T_{regs} im peripheren Blut der Morbus-Crohn-Patienten konnte in derselben Studie jedoch nicht festgestellt werden. Die Anzahl der T_{regs} der Morbus-Crohn-Patienten war sogar leicht erhöht, anstatt erniedrigt. In jener Studie wurden die T_{regs} anhand von $CD4^+$, $CD25^+$ und $CD45RO^+$ bzw. $CD45RA^-$ identifiziert (Takahashi M et al. 2006). $CD45RO^+$ stellt, aktuellen Studien zufolge, einen Marker für aktivierte T_{regs} dar, welche auch als Memory- T_{regs} bezeichnet werden. Naive $CD45RA^+$ - T_{regs} konvergieren nach Aktivierung zu $CD45RO^+$ - T_{regs} (Booth et al. 2010; Buckner 2010; Miyara et al. 2009). Eine inverse Korrelation von T_{regs} mit der Krankheitsaktivität von CU-Patienten spricht in diesem Zusammenhang dafür, dass bei einer erhöhten Krankheitsaktivität der Patienten, die Anzahl aktivierter T_{regs} erniedrigt ist.

Ein Jahr zuvor wurde in Studien von Maul et al. eine inverse Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und der Anzahl der regulatorischen T-Zellen bei Morbus-Crohn- und bei Colitis-ulcerosa-Patienten festgestellt. In diesen Experimenten wurden die regulatorischen T-Zellen anhand von $CD4^+$, $CD25^+$ und $FoxP3^+$ identifiziert (Maul 2005).

Eastaff-Leung et al. haben zudem 2010 eine verminderte Anzahl regulatorischer T-Zellen bei einer gleichzeitig erhöhten Anzahl von T_H17 -Zellen im peripheren Blut von CED-Patienten festgestellt (Eastaff-Leung et al. 2010).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine verminderte Anzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut mit einer erhöhten Krankheitsaktivität von Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa einhergehen. In diesen Untersuchungen wurde jedoch die Identifizierung der regulatorischen T-Zellen lediglich anhand der Oberflächenmerkmale $CD4^+$ und $CD25^+$ bzw. des Transkriptionsfaktors $FoxP3^+$ vollzogen. Liu W. et al. und Seddiki et al. haben allerdings bereits 2006 gezeigt, dass $CD4^+$ und $CD25^+$ -Zellen, welche besonders niedrig $CD127$ exprimieren mit größerer Spezifität regulatorische T-Zellen darstellen (Liu W et al. 2006; Seddiki et al. 2006) und so von T-Helferzellen unterschieden werden können (Hartigan-O'Connor et al. 2007; Law et al. 2009; Liu W et al. 2006), während in anderen Studien belegt wurde, dass $FoxP3$ auch in einem kleinen Subset von aktivierten $CD4^+$ -Zellen, welche keine regulatorischen Fähigkeiten besitzen, exprimiert wird (Gavin et al. 2006; Yagi et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Ergebnisse berücksichtigt und die regulatorischen T-Zellen wurden durchflusszytometrisch zusätzlich mittels der niedrigen Expression von $CD127$ identifiziert. Die vorher beschriebenen Ergebnisse der Studien von Maul et al., Takahashi M et al. und Eastaff-Leung et al. konnten mit der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden, da lediglich eine Tendenz zu einer erniedrigten T_{reg} -Anzahl im peripheren Blut der Patienten mit erhöhter Krankheitsaktivität zu finden war. In weiteren Untersuchungen konnte anhand von 20 Proben gezeigt werden, dass ebenfalls keine Korrelation zwischen der Anzahl regulatorischer T-Zellen und der Krankheitsaktivität der Patienten nachweisbar war, wenn die regulatorischen T-Zellen ohne die niedrige Expression des Oberflächenmarkers $CD127$ quantifiziert wurden. In einer Studie von 2010 wurde von Simonetta und Chiali et al. indes dargestellt, dass $CD127$ einen Aktivitätsmarker von T_{regs} darstellt. Aktivierte regulatorische T-Zellen sollen somit eine erhöhte Expression von $CD127$ besitzen. In weiteren Untersuchungen könnte deshalb überprüft werden, ob $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD127^+$ -T-Zellen mit der Krankheitsaktivität von CED-Patienten eine höhere Korrelation aufweisen als $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD127^-$ -T-Zellen.

Wie bereits erwähnt wurde, besteht im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Studien, in dieser Arbeit keine signifikante Korrelation zwischen den Krankheitsaktivitätsindices und der Anzahl der regulatorischen T-Zellen, weshalb sich die regulatorischen T-Zellen vermutlich

nicht als Marker des Immunstatus von CED-Patienten oder als Unterscheidungsmarker zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa eignen. Es wurde lediglich ein tendenzieller Unterschied zwischen der Anzahl regulatorischer T-Zellen bei Patienten in Remission und mit erhöhter Krankheitsaktivität dargelegt. Dies weist auf eine Beteiligung der regulatorischen T-Zellen in der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen hin, zeigt aber auch ihre Komplexität und ihre Abhängigkeit von verschiedenen weiteren Faktoren auf. Ein solcher weiterer Faktor, welcher für zukünftige CED-Studien von Interesse sein könnte, ist zum Beispiel der OX40-Signalweg. Es wurde in einer 2010 veröffentlichten Studie erörtert, dass ohne OX40 die Unterdrückung einer induzierten Colitis durch regulatorische T-Zellen nicht möglich ist. OX40 wird für die Akkumulation von T_{regs} im Colon benötigt und hat somit eine entscheidende Funktion bei der Verhinderung einer Autoimmunreaktion durch T_{regs} im Gastrointestinaltrakt (Griseri et al. 2010).

Für zukünftige Untersuchungen wäre außerdem die gegenläufige Regulation von $T_{\text{H}}17$ - und regulatorischen T-Zellen interessant. Es wird angenommen, dass normalerweise durch Zytokine wie TGF- β regulatorische T-Zellen zur Proliferation angeregt werden, um Autoimmunreaktionen zu verhindern. Bei Immunopathien wie der CED könnte durch eine zu hohe Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie dem IL-6 und zu niedrigen Konzentrationen von entzündungshemmenden Zytokinen wie dem TGF- β die Balance des Immunsystems hin zu einer $T_{\text{H}}17$ -Zellvermittelten Immunreaktion gestört sein (Eastaff-Leung et al. 2010; Korn et al. 2009; Strisciuglio und van Deventer 2010). Von Interesse wäre es somit die Ursache für diese fehlgeleitete Immunregulation zu finden.

Dass im Gegensatz zu den hier vorgelegten Ergebnissen in den Studien von Takahashi M. et al. und Maul et al. jeweils eine negative Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität der CED-Patienten und der Anzahl ihrer regulatorischen T-Zellen gefunden wurde, könnte unter anderem mit der Auswahl an Antikörpern und Puffern und ihrer Kombination zusammenhängen, denn wie Law et al. 2009 belegt haben, resultiert aus den gleichen Antikörpern verschiedener Klone, aber auch von verschiedenen Firmen, jeweils eine unterschiedliche Anzahl von regulatorischen T-Zellen in der durchflusszytometrischen Analytik (Law et al. 2009). So konnte in den Experimenten von Law et al. gezeigt werden, dass bei dem Anfärben der regulatorischen T-Zellen mittels des CD25-Antikörpers je nach Puffer-Antikörper-Kombination, mit einer Spanne von 4,2% bis 35,3 % $CD25^+$ -Zellen von $CD4^+$ -Zellen, große Unterschiede in der Anzahl der quantifizierten Zellen bestanden. Es

wurde des Weiteren eruiert, dass sich der M-A251-Klon des CD25-Antikörpers besonders gut für die Quantifizierung dieser Zellen eignet, da er weniger Zellen aber dafür die Zellen mit einer besonders hohen Expression von CD25 anfärbt. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass mit dem Anfärben mittels eines Isotyp-Kontroll-Antikörpers eine gute Methode vorhanden ist, um unspezifische Hintergrundsignale bzw. die Autofluoreszenz der Zellen zu messen und bei der Quantifizierung der regulatorischen T-Zellen zu berücksichtigen. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich der 259D/C7- Klon der FoxP3-Antikörper am besten zur Quantifizierung regulatorischer T-Zellen bei vorher gefrorenen PBMCs eignet (Law et al. 2009). All diese Erkenntnisse wurden in dieser Studie berücksichtigt, führten aber evtl. zu einer etwas anderen Wertelage im Vergleich mit den vorher erwähnten Studien.

Somit liegt in der hohen Variabilität der Quantifizierung der regulatorischen T-Zellen je nach Puffer, Antikörper und ihrer Kombination, generell eine Schwäche der FACS-Analytik und es werden standardisierte Probenaufbereitungs-, Färbe- und Messverfahren, Antikörper und Puffer-Kits benötigt, welche die Quantifizierung regulatorischer T-Zellen einheitlich ermöglichen und damit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboratorien sicherstellen.

Ein weiterer Grund für die fehlende Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und der Anzahl an regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut der Patienten könnte an der geringen Spannbreite der Krankheitsaktivität der Patienten liegen, denn nach den patienteneigenen Angaben zum Allgemeinbefinden befand sich keiner der Morbus-Crohn- oder Colitis-ulcerosa-Patienten in einem „unerträglichen“ Gesundheitszustand. Die Ergebnisse zur Befragung der Morbus-Crohn-Patienten zum Allgemeinbefinden zeigten sogar, dass alle dieser Patienten über einen „guten“, „beeinträchtigten“ oder selten einen „schlechten“, nie jedoch über einen „sehr schlechten“ oder „unerträglichen“ Gesundheitszustand verfügten. Die Mehrzahl der Patienten hatte somit einen sehr ähnlichen Krankheitszustand. Dies führte evtl. dazu, dass der Unterschied in der Krankheitsaktivität der Patienten nicht groß genug war, um sich in einem signifikanten Unterschied in der jeweiligen Anzahl der regulatorischen T-Zellen niederzuschlagen.

Ob sich regulatorische T-Zellen als Biomarker des Immunsystems individuell für jeden Patienten eignen, müsste in longitudinalen Studien mit mehreren FoxP3-Quantifizierungen von jeweils einem Patienten untersucht werden. Interessant wäre es zu untersuchen, ob sich die Anzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut der Patienten mit einer

Verschlechterung oder Verbesserung der Krankheitsaktivität oder nach der Therapie mit diversen Medikamenten verändert.

4.2.2. Die Quantifizierung regulatorischer T-Lymphozyten mittels eines DNA-Methylierungsassays

Die Anzahl der regulatorischen T-Lymphozyten, gemessen in einem DNA-Methylierungsassay, korrelierte nicht mit den Krankheitsaktivitätsindices der Patienten. Dies stellte weiterhin die unzureichende Brauchbarkeit von Einzelmessungen regulatorischer T-Zellen als immunologische Biomarker für die Krankheitsaktivität von CED-Patienten dar. Die Anzahl der regulatorischen T-Zellen gemessen mithilfe des DNA-Methylierungsassays waren tendenziell sogar bei den Patienten in Remission niedriger als bei den Patienten mit erhöhter Krankheitsaktivität.

Die Mediane der T_{reg} -Anzahl aus dem DNA-Methylierungsassay waren niedriger als jene aus der FACS-Analytik. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Wieczorek et al. (Wieczorek et al. 2009) und liegt zum einen daran, dass die T_{regs} in der Durchflusszytometrie als prozentualer Anteil der $CD4^+$ -Zellen und die T_{regs} mittels des DNA-Methylierungsassays als Anteil der gesamten Zellen des Vollblutes ermittelt wurden. Zum anderen könnte der Unterschied mit der zusätzlichen Quantifizierung von aktivierten Effektor-T-Zellen in der Durchflusszytometrie erklärt werden. Diese aktivierten T-Zellen exprimieren nur transient FoxP3 und werden in dem DNA-Methylierungsassay nicht quantifiziert, da bei diesen Zellen die TSDR-Region, wie bei den übrigen Immunzellen, methyliert und nicht demethyliert ist (Floess et al. 2007).

Des Weiteren korrelierte die Anzahl der Tregs aus dem DNA-Methylierungsassay nicht mit jener aus der FACS-Analytik. Dieses Ergebnis stimmt nicht mit jenem von Liu J et al. überein, denn in ihren Untersuchungen mit Nabelschnurblut korrelierte die Anzahl regulatorischer T-Zellen aus der durchflusszytometrischen Untersuchung mit jener Anzahl aus dem DNA-Methylierungsassay in hohem Maße (Liu J et al. 2010). Die Spannweite der Ergebnisse war mit der aus dieser Arbeit zu vergleichen. Auch in den Untersuchungen von Sehouli et al. wurde eine positive Korrelation zwischen der durchflusszytometrisch bestimmten Anzahl von $CD4^+CD25^+CD127^-$ -Zellen und der Anzahl von, den mithilfe eines DNA-Methylierungsassays quantifizierten, T_{regs} festgestellt (Sehouli et al. 2011).

4.2.3. Vergleich der beiden Methoden zur Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen

Die fehlende Korrelation zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden zur Quantifizierung regulatorischer T-Zellen deutet darauf hin, dass sich mithilfe dieser Methoden nicht dieselbe Population regulatorischer T-Zellen bestimmen lässt.

Die wesentlich häufiger angewandte Methode zur Quantifizierung von T_{regs} ist die der Durchflusszytometrie. Sie wurde in zahlreichen Studien zur Quantifizierung regulatorischer T-Zellen genutzt und erscheint als relativ etabliert, auch wenn zum Teil große Unterschiede bei der Quantifizierung der Zellen in Abhängigkeit von den verwendeten Antikörpern, Puffern und den Einstellungen der Gates entstehen. Die Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen im DNA-Methylierungsassay stellt eine relativ neue Methode dar, welche erst 2007 von Floess et al. und Baron et al. vorgestellt wurden (Baron et al. 2007; Floess et al. 2007).

Eine fehlende Korrelation zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden ist nicht verwunderlich, da zum einen mithilfe der Durchflusszytometrie, im Gegensatz zum DNA-Methylierungsassays, auch transient FoxP3-exprimierende T-Zellen quantifiziert werden und zum anderen mittels des DNA-Methylierungsassays auch $CD8^+$ -FoxP3⁺-T-Zellen mit berücksichtigt werden (Mayer et al. 2011; Shalev et al. 2012).

Ein weiterer Unterschied in der Anzahl der T_{regs} , gemessen mithilfe der zwei verschiedenen Methoden, liegt auch darin begründet, dass die T_{reg} -Anzahl mithilfe der Durchflusszytometrie aus isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes der Patienten quantifiziert wird, während sie im DNA-Methylierungsassay im Vollblut der Patienten gemessen wird. Der Anteil der T_{regs} bezieht sich in der Durchflusszytometrie somit auf die Gesamtheit der $CD4^+$ -Zellen, während er sich nach dem DNA-Methylierungsassay auf die gesamten DNA-haltigen Zellen des Vollblutes bezieht. Dadurch kann es zu einer Veränderung des Anteils der T_{regs} aus dem DNA-Methylierungsassay kommen, sobald sich der Anteil der restlichen Zellen des Vollblutes verändert, obwohl die Anzahl der Tregs gleichbleibt. Da bei der Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wahrscheinlich auch Veränderungen der übrigen Zellen und ihrer Anzahl im Blut auftreten, wäre es sinnvoll einen Quotienten aus den T_{regs} und der Gesamtheit der T-Zellen bzw. $CD3^+$ -Zellen zu bilden. Dieser Quotient wäre unempfindlich gegenüber Zellzahl-Schwankungen der übrigen Blutzellen und könnte zudem

die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der T_{reg} -Quantifizierung mit dem DNA-Methylierungsassay verbessern. So könnte mithilfe eines zweiten epigenetischen Assays bzw. DNA-Methylierungsassays anhand einer für $CD3^+$ -Zellen spezifischen Region, der CD3G/CD3D-Region, die Anzahl der gesamten T-Zellen quantifiziert werden. Daraufhin wäre es möglich aus den T_{regs} und den so quantifizierten gesamten T-Zellen ($CD3^+$ -Zellen) einen Quotienten zu bilden. Ein solcher Quotient wurde bereits in der Studie von Sehouli et al. zu Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten angewandt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Quotient von Tregs zu $CD3^+$ -Zellen in Tumorgewebe im Verhältnis zu gesundem Gewebe stark erhöht ist (Sehouli et al. 2011).

Auch der Vergleich zwischen der Anzahl der T_{regs} , gemessen mittels des DNA-Methylierungsassays und der Durchflusszytometrie wäre durch den Quotienten besser möglich. Hierfür erscheint jedoch ein Quotient aus T_{regs} und $CD4^+$ -Zellen noch sinnvoller. So könnte man mit beiden Methoden den Anteil der regulatorischen T-Zellen von der Gesamtheit der $CD4^+$ -Zellen quantifizieren und einen adäquaten Vergleich der beiden Methoden anstellen.

Für zukünftige Studien wäre es außerdem interessant zu klären, ob abgesehen von den transient-FoxP3-exprimierenden T_{regs} noch weitere Subpopulationen von T-Zellen existieren, welche FoxP3 transient oder permanent exprimieren, aber eventuell noch anhand weiterer Merkmale voneinander unterschieden werden müssen. So wurden bereits $CD8^+CD25^+FoxP3^+$ -Zellen entdeckt, welche jedoch keine stark suppressiven Fähigkeiten besitzen (Mayer et al. 2011; Shalev et al. 2012). Jedoch ist anzunehmen, dass auch durch die Existenz dieser $CD8^+CD25^+FoxP3^+$ -Zellen eine Korrelation zwischen den beiden Methoden erschwert möglich ist, denn mithilfe des DNA-Methylierungsassays wird diese Zellpopulation nicht bestimmt, während bei der Bestimmung von T_{regs} in der Durchflusszytometrie lediglich die $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD127^-$ -Zellen quantifiziert werden.

Auch ein Unterschied im Verhältnis zwischen den aktivierten, transient-FoxP3-exprimierenden T_{regs} zu den naiven T_{regs} könnte schon einen Faktor bei der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen darstellen. Floess et al. haben postuliert, dass es mittels des DNA-Methylierungsassays möglich ist die Anzahl regulatorischer T-Zellen mit einer höheren Präzision als mithilfe der FACS-Analytik zu bestimmen, da anhand des DNA-Methylierungsassays nur Zellen mit einem stabilen Treg-Phänotyp, und keine aktivierten Effektor-T-Zellen, welche FoxP3 nur transient exprimieren, quantifiziert werden (Baron et al.

2007; Floess et al. 2007; Wieczorek et al. 2009). Die Rolle von aktivierten Effektor-T-Zellen mit transienter FoxP3-Expression ist noch nicht umfassend geklärt. Jedoch könnte in dieser Aussage auch ein Teil der Antwort auf die Frage liegen, warum mithilfe des DNA-Methylierungsassays im Vergleich zur FACS-Analytik mehr T_{regs} bei Patienten mit erhöhter Krankheitsaktivität als bei Patienten mit erniedrigter Krankheitsaktivität quantifiziert wurden und warum zwischen den beiden Methoden zur T_{reg} -Quantifizierung keine signifikante Korrelation gefunden werden konnte.

5. Zusammenfassung

Zurzeit existieren keine validen Biomarker, welche die Krankheitsaktivität oder das Rezidiv-Risiko von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen objektivierbar machen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Biomarker des Immunmonitorings auf ihren Nutzen bei der Beurteilung der Krankheitsaktivität von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) untersucht. Hierzu wurde bei 98 Patienten mit CED, nach positivem Votum der Ethikkommission, die intrazelluläre ATP-Konzentration der CD4⁺-Zellen gemessen, um diese mit der Krankheitsaktivität der Patienten in Bezug zu setzen. Die Patientendaten wurden zuvor mithilfe von standardisierten Fragebögen erhoben, um daraufhin die Krankheitsaktivitätsindices CDAI, HBI und SCCAI aus den klinischen Daten zu ermitteln.

Es wurde keine signifikante Korrelation zwischen der ATP-Konzentrationen und der Krankheitsaktivität der Patienten festgestellt. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass Einzelmessungen der intrazellulären ATP-Konzentration von Lymphozyten nicht die Krankheitsaktivität von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen widerspiegeln. Ein signifikanter Unterschied der intrazellulären ATP-Konzentration CD4⁺-Zellen wurde allerdings zwischen Patienten mit und ohne Infliximab-Therapie nachgewiesen. Die Patienten, die unter einer Infliximab-Therapie standen, hatten signifikant niedrigere intrazelluläre ATP-Konzentrationen der Lymphozyten ($p < 0,01$, Mann-Whitney-U). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass Infliximab als TNF- α -Blocker die Immunantwort bzw. die Aktivität von Lymphozyten inhibiert. Mithilfe der intrazellulären ATP-Konzentration wäre somit evtl. ein Werkzeug gegeben, um die Effektivität der Inhibierung der lymphozytären Immunreaktion durch TNF- α -Blocker zu kontrollieren.

Weiterhin wurde bei 99 CED-Patienten die Anzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut bestimmt. Hierfür wurden die Zellen mithilfe von CD4-, CD25-, CD127- und FoxP3-Antikörpern angefärbt und mittels der FACS-Analytik quantifiziert. Anschließend wurde die so ermittelte Anzahl regulatorischer T-Zellen (CD4⁺CD25^{high}CD127⁻FoxP3⁺-Zellen) mit der Krankheitsaktivität der Patienten korreliert. Auch dabei wurde keine signifikante Korrelation nachgewiesen. Bei der Unterteilung der Patienten in Gruppen mit erhöhter und erniedrigter Krankheitsaktivität deutete sich ein Unterschied bezüglich der Anzahl regulatorischer T-Zellen an, der jedoch nicht signifikant war ($p = 0,073$, Mann-Whitney-U-Test). Diese

Ergebnisse führten zu der Annahme, dass sich die durchflusszytometrisch quantifizierte Anzahl regulatorischer T-Zellen ebenfalls nicht als Surrogatmarker für die Krankheitsaktivität von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eignet. Zudem wurde postuliert, dass die Quantifizierung von T_{regs} keine Hilfe bei der Unterscheidung zwischen den beiden Erkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa liefern kann. Der tendenzielle Unterschied in der Anzahl von T_{regs} zwischen Patienten mit niedriger und erhöhter Krankheitsaktivität zeigt jedoch, dass regulatorische T-Zellen bei der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle zu spielen scheinen. Allerdings deutet sich auch eine Abhängigkeit von weiteren pathogenen Faktoren in der komplexen Ätiologie von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen an.

Bei 35 der CED-Patienten wurde zusätzlich eine weitere Methode zur Quantifizierung regulatorischer T-Zellen angewendet. Hierbei handelte es sich um einen DNA-Methylierungsassay, welcher die regulatorischen T-Zellen anhand einer spezifischen Demethylierungsregion der DNA (TSDR) ermittelt. Diese TSDR ist bei den T_{regs} demethyliert, während sie bei allen anderen Zellen des Blutes methyliert ist. Die Ergebnisse dieses Assays korrelierten jedoch nicht mit der Krankheitsaktivität der Patienten und korrelierten auch nicht mit den Ergebnissen für die Anzahl regulatorischer T-Zellen aus der FACS-Analytik. Diese Tatsache könnte zum einen darauf beruhen, dass in der FACS-Analytik im Gegensatz zum DNA-Methylierungsassay auch aktivierte T-Effektorzellen quantifiziert werden, welche nur transient FoxP3 exprimieren. Zum anderen werden mittels des DNA-Methylierungsassays auch $CD8^+FoxP3^+$ -Zellen quantifiziert, welche keine oder geringe regulatorischen Eigenschaften besitzen und in der Durchflusszytometrie nicht quantifiziert werden. Zudem könnte eine fehlende Korrelation zwischen den Ergebnissen der beiden Verfahren auch daran liegen, dass sich die quantifizierten T_{regs} aus der Durchflusszytometrie auf die Gesamtheit der $CD4^+$ -Zellen beziehen, während sich die T_{regs} des DNA-Methylierungsassays auf die gesamten DNA-haltigen Zellen des Vollblutes beziehen. Zur besseren Vergleichbarkeit könnte in zukünftigen Studien ein Quotient aus T_{regs} und $CD4^+$ -Zellen gebildet werden.

Zusammenfassend hat sich im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass sich weder mithilfe der intrazellulären ATP-Konzentrationen von Lymphozyten noch der Anzahl regulatorischer T-Zellen eine Aussage bezüglich der Krankheitsaktivität oder des Rezidivrisikos von CED-Patienten treffen lässt. Da die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen derzeit nicht

heilbar sind, werden weitere Surrogatmarker zum Objektivieren der Krankheitsaktivität benötigt, um Krankheitsrezidiven zeitnah entgegenwirken zu können.

6. Anhang

6.1. Patientenaufklärung

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir möchten Sie bitten, an einer **wissenschaftlichen Untersuchung** teilzunehmen.

Hierfür benötigen einige Angaben zu Ihrer Erkrankung sowie Blutproben, aus denen die Bestimmung von ATP und verwandten Molekülen in CD4+-Lymphozyten (Energieträger in bestimmten weißen Blutkörperchen) sowie bestimmter Oberflächenbestandteile der Lymphozyten mittels einer durchflusszytometrischen Untersuchung durchgeführt werden. Diese Studie dient der Abschätzung der zellulären Immunantwort bei Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn und soll zu einer Verbesserung der immununterdrückenden Therapie beitragen.

Wenn Sie Ihr Einverständnis zur Teilnahme an dieser Untersuchung geben, werden Ihnen **zwei zusätzliche Blutproben** (insgesamt ca. 12 ml) durch Venenpunktion entnommen. Wir möchten Sie außerdem bitten, den angehängten **Fragebogen** vollständig auszufüllen.

Gelegentlich kann es bei der Blutentnahme zu einer leichten Rötung und Schwellung an der Entnahmestelle kommen. In seltenen Fällen kann dort eine Infektion bzw. Nervenverletzung entstehen. Abgesehen von der Blutentnahme, die im Rahmen ihrer Behandlung erfolgt, entsteht Ihnen kein zusätzliches Risiko.

Die Proben werden für maximal zwei Jahre innerhalb der Universitätsmedizin Göttingen aufbewahrt. Die Ergebnisse der Messungen werden in verschlüsselter Form gespeichert. Die Weitergabe ausgewerteter Daten erfolgt ausschließlich in anonymisierter Form. Eine Veröffentlichung der Datenauswertung nach Abschluss der entsprechenden Studie ist geplant und erfolgt ebenfalls anonymisiert.

Die Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Untersuchung ist freiwillig! Sie können jederzeit ohne Angabe von Gründen die Zustimmung zur Teilnahme an der Untersuchung widerrufen.

Für weitere Fragen stehen wir Ihnen jederzeit persönlich oder telefonisch gerne zur Verfügung. Herzlichen Dank für Ihre Mitarbeit!

Mit freundlichen Grüßen,

Dr. med. G. Brandhorst

Tel. 0551-398062

Pieper 919-1227

6.2. Fragebogen (Morbus Crohn)

Ihr(e) behandelnde(r) Arzt/Ärztin wird diesen Fragebogen bei Bedarf gerne mit Ihnen zusammen durchgehen.

1. Ihr **Alter**? _____ Jahre
2. Ihr **Geschlecht**? Männlich Weiblich
3. Wie oft haben Sie **flüssige/weiche Stuhlgänge** am Tag (Durchschnitt der letzten 7 Tage)? _____
4. Wie beurteilen Sie Ihre **Bauchschmerzen** (Durchschnitt der letzten 7 Tage)?
 - keine leicht mittel stark
5. Wie war ihr **Allgemeinbefinden** (Durchschnitt der letzten 7 Tage)?
 - gut beeinträchtigt schlecht sehr schlecht unerträglich
6. Leiden Sie an einer der folgenden mit Morbus Crohn assoziierten **Beschwerden**?
 - Gelenkschmerzen oder Arthritis? Ja Nein
 - Augenbeteiligung? Ja Nein
 - Hautbeteiligung (z.B. Erythema nodosum, orale Aphthen)? Ja Nein
 - Analfissur, anale Fisteln oder perianale Abszesse? Ja Nein
 - Andere Fisteln? Ja Nein
 - Fieber (über 37,7 °C) innerhalb der letzten sieben Tage? Ja Nein
7. Wie ist Ihr **Gewicht**? _____ kg
8. Welche **Medikamente** nehmen Sie zur Zeit ein?

<u>Name des Medikaments</u>	<u>Dosis</u> (z.B. 3x50mg)	<u>Einnahme seit</u>		
		<1Woche	1-4 Wochen	>4 Wochen
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

6.3. Fragebogen (Colitis ulcerosa)

Ihr(e) behandelnde(r) Arzt/Ärztin wird diesen Fragebogen bei Bedarf gerne mit Ihnen zusammen durchgehen.

1. Ihr **Alter**? _____ Jahre

2. Ihr **Geschlecht**? Männlich Weiblich

3. Wie oft haben Sie **Stuhlgänge pro Tag**?

1-3 4-6 7-9 >9

4. Wie oft haben Sie **Stuhlgänge pro Nacht**?

1-3 4-6

5. Wie stark ist der **Stuhldrang**?

Mäßig (eilig) Stark (unverzüglich) Inkontinenz

6. Haben Sie **Blut im Stuhl**?

Spuren Gelegentlich Immer

7. Wie ist Ihr **Allgemeinbefinden**?

Sehr gut Leicht erniedrigt Schlecht Sehr schlecht Unerträglich

8. Leiden Sie an **weiteren Beschwerden**, die mit der Colitis ulcerosa zusammenhängen? (z.B. Gelenkerkrankungen, Augenmanifestationen, Lebererkrankungen, Hauterkrankungen)

7. Wie ist Ihr **Gewicht**? _____ kg

8. Welche **Medikamente** nehmen Sie zur Zeit ein?

<u>Name des Medikaments</u>	<u>Dosis</u> (z.B. 3x50mg)	<u>Einnahme seit</u>		
		<1Woche	1-4 Wochen	>4 Wochen
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

6.4. Einverständniserklärung

Ich wurde von meinem Arzt vollständig über Wesen, Bedeutung und Tragweite der wissenschaftlichen Untersuchung aufgeklärt. Ich habe den Aufklärungstext gelesen und verstanden. Ich hatte die Möglichkeit, Fragen zu stellen, und habe die Antworten verstanden und akzeptiere sie. Mein Arzt hat mich darüber informiert, dass die Teilnahme an dieser Untersuchung freiwillig ist und für mich kein wesentliches Risiko birgt.

Ich hatte ausreichend Zeit, mich zur Teilnahme an dieser Studie zu entscheiden und weiß, dass die Teilnahme freiwillig ist. Ich weiß, dass ich jederzeit und ohne Angaben von Gründen diese Zustimmung widerrufen kann. Mir ist bekannt, dass meine persönlichen Daten in verschlüsselter Form gespeichert werden.

Ich habe eine Kopie der Patienteninformation und dieser Einwilligungserklärung erhalten. Ich erkläre hiermit meine freiwillige Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Studie.

Ort und Datum

Unterschrift des Patienten

Ort und Datum

Unterschrift des aufklärenden Arztes

6.5. Primersequenzen

Methylierte *FOXP3*-DNA *forward primer*:

5' GTTTTCGATTTGTTTAGATTTTTTCGTT 3'

Methylierte *FOXP3*-DNA *reverse primer*:

5' CCTCTTCTCTTCCTCCGTAATATCG 3'

Nicht-Methylierte *FOXP3*-DNA *forward primer*:

5' GTTTTTGATTTGTTTAGATTTTTTTGTT 3'

Nicht-Methylierte *FOXP3*-DNA *reverse primer*:

5' CCTCTTCTCTTCCTCCATAATATCA 3'

7. Literaturverzeichnis

Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT (2002): Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 8, 1024-1032

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG (2004): Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 5, 266-271

Aranda R, Sydora BC, McAllister PL, Binder SW, Yang HY, Targan SR, Kronenberg M (1997): Analysis of intestinal lymphocytes in mouse colitis mediated by transfer of CD4+, CD45RBhigh T cells to SCID recipients. *J Immunol* 158, 3464-3473

Arndt-Jovin DJ, Jovin TM (1974): Computer-Controlled Multiparameter Analysis and Sorting of Cells and Particles. *J Histochem Cytochem* 22, 622-625

Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F (1999): An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 190, 995-1004

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

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA (2001): CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167, 1245-1253

Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA (2002): Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. *J Immunol* 169, 6210-6217

Bakhach J (2009): The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis* 5, 119-126

Bamias G, Sugawara K, Pagnini C, Cominelli F (2003): The Th1 immune pathway as a therapeutic target in Crohn's disease. *Curr Opin Investig Drugs* 4, 1279-1286

Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grutzkau A, Dong J, Thiel A, Boeld TJ, Hoffmann P, Edinger M, Turbachova I, Hamann A, Olek S, Huehn J (2007): DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol* 37, 2378-2389

Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM (2008): Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 40, 955-962

Batal I, Zeevi A, Heider A, Girnita A, Basu A, Tan H, Shapiro R, Randhawa P (2008): Measurements of global cell-mediated immunity in renal transplant recipients with BK virus reactivation. *Am J Clin Pathol* 129, 587-591

- Baumgart DC (2009): The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int* 106, 123-133
- Baumgart DC, Sandborn WJ (2007): Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 369, 1641-1657
- Baumgart DC, Bernstein CN, Abbas Z, Colombel JF, Day AS, D'Haens G, Dotan I, Goh KL, Hibi T, Kozarek RA (2011): IBD Around the world: comparing the epidemiology, diagnosis, and treatment: proceedings of the World Digestive Health Day 2010--Inflammatory Bowel Disease Task Force meeting. *Inflamm Bowel Dis* 17, 639-644
- Bennett CL, Ochs HD (2001): IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena. *Curr Opin Pediatr* 13, 533-538
- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD (2001): The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27, 20-21
- Best WR (2006): Predicting the Crohn's disease activity index from the Harvey-Bradshaw Index. *Inflamm Bowel Dis* 12, 304-310
- Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F, Jr. (1976): Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 70, 439-444
- Beyer M, Schultze JL (2006): Regulatory T cells in cancer. *Blood* 108, 804-811
- Bhorade SM, Janata K, Vigneswaran WT, Alex CG, Garrity ER (2008): Cylex ImmuKnow assay levels are lower in lung transplant recipients with infection. *J Heart Lung Transplant* 27, 990-994
- Bloom BR, Salgame P, Diamond B (1992): Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunol Today* 13, 131-136
- Booth NJ, McQuaid AJ, Sobande T, Kissane S, Agius E, Jackson SE, Salmon M, Falciani F, Yong K, Rustin MH (2010): Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4+ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J Immunol* 184, 4317-4326
- Boyum A (1968): Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97, 7
- Bradley LM (2003): Migration and T-lymphocyte effector function. *Curr Opin Immunol* 15, 343-348
- Brandhorst G, Oellerich M, Brunet M, Kowalski R, Vinks A, Wallemacq P (2011): Individually tailored immunosuppression: is there a role for biomarkers? *Clin Chem* 57, 376-381
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F (2001): Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27, 68-73
- Buckner JH (2010): Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 10, 849-859

Cabrera R, Ararat M, Soldevila-Pico C, Dixon L, Pan JJ, Firpi R, Machicao V, Levy C, Nelson D, Morelli G (2009): Using an immune functional assay to differentiate acute cellular rejection from recurrent hepatitis C in liver transplant patients. *Liver Transpl* 15, 216-222

Cadillo-Chavez R, de Echegaray S, Santiago-Delpin EA, Rodriguez-Trinidad AT, Camacho-Carrazo B, Alfaro T, Saavedra-Pozo M, Carrasquillo L, Gonzalez-Caraballo ZA, Morales-Otero LA (2006): Assessing the risk of infection and rejection in Hispanic renal transplant recipients by means of an adenosine triphosphate release assay. *Transplant Proc* 38, 918-920

Chen X, Zehnbauer B, Gnirke A, Kwok PY (1997): Fluorescence energy transfer detection as a homogeneous DNA diagnostic method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10756-10761

Cho JH (2008): The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 8, 458-466

Choi S, Schwartz RH (2007): Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models. *Semin Immunol* 19, 140-152

Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA (2007): The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566-569

Cooper GS, Stroehla BC (2003): The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2, 119-125

Corthay A (2009): How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 70, 326-336

Crawford A, Wherry EJ (2009): The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Curr Opin Immunol* 21, 179-186

Croft M (2003): Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 3, 609-620

Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ (2009): Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30, 626-635

Curotto de Lafaille MA, Muriglan S, Sunshine MJ, Lei Y, Kutchukhidze N, Furtado GC, Wensky AK, Olivares-Villagomez D, Lafaille JJ (2001): Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *J Exp Med* 194, 1349-1359

Daniel C, Nolting J, von Boehmer H (2009): Mechanisms of self-nonsel self discrimination and possible clinical relevance. *Immunotherapy* 1, 631-644

Dittrich W, Gohde W (1969): Impulse fluorometry of single cells in suspension. *Z Naturforsch B* 24, 360-361

Doumas BT, Watson WA, Biggs HG (1971): Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 31, 87-96

- Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH (1995): Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 102, 448-455
- Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A (2006): A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314, 1461-1463
- Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, Cummins A, Barry S (2010): Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 30, 80-89
- Eda S, Kaufmann J, Roos W, Pohl S (1998): Development of a new microparticle-enhanced turbidimetric assay for C-reactive protein with superior features in analytical sensitivity and dynamic range. *J Clin Lab Anal* 12, 137-144
- Elson CO, Cong Y, Weaver CT, Schoeb TR, McClanahan TK, Fick RB, Kastelein RA (2007): Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* 132, 2359-2370
- Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang HD, Bopp T, Schmitt E (2007): Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 5, e38
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003): Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330-336
- Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y (2003): Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52, 65-70
- Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ (2002): Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med* 196, 851-857
- Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI (2007): Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109, 2058-2065
- Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, Ocheltree EL, Greenberg PD, Ochs HD, Rudensky AY (2006): Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6659-6664
- Gershon RK, Kondo K (1970): Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18, 723-737
- Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liebhaber SA (1972): Suppressor T cells. *J Immunol* 108, 586-590
- Goh K, Xiao SD (2009): Inflammatory bowel disease: a survey of the epidemiology in Asia. *J Dig Dis* 10, 1-6
- Graff LA, Walker JR, Lix L, Clara I, Rawsthorne P, Rogala L, Miller N, Jakul L, McPhail C, Ediger J (2006): The relationship of inflammatory bowel disease type and activity to psychological functioning and quality of life. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4, 1491-1501

- Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK (1998): CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol* 18, 389-418
- Griseri T, Asquith M, Thompson C, Powrie F (2010): OX40 is required for regulatory T cell-mediated control of colitis. *J Exp Med* 207, 699-709
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005): Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6, 1123-1132
- Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM (2007): Human CD4⁺ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods* 319, 41-52
- Harvey RF, Bradshaw JM (1980): A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet* 1980,1, 514
- Himmel ME, Hardenberg G, Piccirillo CA, Steiner TS, Levings MK (2008): The role of T-regulatory cells and Toll-like receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease. *Immunology* 125, 145-153
- Hindorf U, Lindqvist M, Peterson C, Soderkvist P, Strom M, Hjortswang H, Pousette A, Almer S (2006): Pharmacogenetics during standardised initiation of thiopurine treatment in inflammatory bowel disease. *Gut* 55, 1423-1431
- Holmen N, Lundgren A, Lundin S, Bergin AM, Rudin A, Sjoval H, Ohman L (2006): Functional CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity. *Inflamm Bowel Dis* 12, 447-456
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003): Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061
- Hoves S, Trapani JA, Voskoboinik I (2010): The battlefield of perforin/granzyme cell death pathways. *J Leukoc Biol* 87, 237-243
- Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA (1969): Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* 166, 747-749
- Huskey J, Gralla J, Wiseman AC (2011): Single time point immune function assay (ImmuKnow) testing does not aid in the prediction of future opportunistic infections or acute rejection. *Clin J Am Soc Nephrol* 6, 423-429
- Huter EN, Stummvoll GH, DiPaolo RJ, Glass DD, Shevach EM (2008): Cutting edge: antigen-specific TGF beta-induced regulatory T cells suppress Th17-mediated autoimmune disease. *J Immunol* 181, 8209-8213
- Inohara N, Nunez G (2003): NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 3, 371-382
- Ishizaka A, Tono-oka T, Matsumoto S (1984): Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J Immunol Methods* 72, 127-132

- Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH (2001): Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193, 1285-1294
- Jowett CJS, J.R. Barton, M.R. Welfare (2001): Use of the simple clinical colitis activity Index (SCCAI) to define relapse of ulcerative colitis (UC). *Gut* 48, A1
- Karre K (1991): MHC gene control of the natural killer system at the level of the target and the host. *Semin Cancer Biol* 2, 295-309
- Khattari R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F (2003): An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4, 337-342
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2009): IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27, 485-517
- Kowalski R, Post D, Schneider MC, Britz J, Thomas J, Deierhoi M, Lobashevsky A, Redfield R, Schweitzer E, Heredia A (2003): Immune cell function testing: an adjunct to therapeutic drug monitoring in transplant patient management. *Clin Transplant* 17, 77-88
- Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB, Sebastian A, Wright HI, Sigle G, Burdick J, Elmagd KA, Zeevi A, Lopez-Cepero M (2006): Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation* 82, 663-668
- Ksontini R, MacKay SL, Moldawer LL (1998): Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation. *Arch Surg* 133, 558-567
- Kullberg MC, Jankovic D, Gorelick PL, Caspar P, Letterio JJ, Cheever AW, Sher A (2002): Bacteria-triggered CD4(+): T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. *J Exp Med* 196, 505-515
- Lakatos PL, Fischer S, Lakatos L (2006): Is the epidemiology of inflammatory bowel disease changing in Eastern Europe? *Scand J Gastroenterol* 41, 871-872
- Lappalainen M, Halme L, Turunen U, Saavalainen P, Einarsdottir E, Farkkila M, Kontula K, Paavola-Sakki P (2008): Association of IL23R, TNFRSF1A, and HLA-DRB1*0103 allele variants with inflammatory bowel disease phenotypes in the Finnish population. *Inflamm Bowel Dis* 14, 1118-1124
- Law JP, Hirschhorn DF, Owen RE, Biswas HH, Norris PJ, Lanteri MC (2009): The importance of Foxp3 antibody and fixation/permeabilization buffer combinations in identifying CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Cytometry A* 75, 1040-1050
- LeBien TW, Tedder TF (2008): B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570-1580
- Lee SS, Gao W, Mazzola S, Thomas MN, Csizmadia E, Otterbein LE, Bach FH, Wang H (2007): Heme oxygenase-1, carbon monoxide, and bilirubin induce tolerance in recipients toward islet allografts by modulating T regulatory cells. *Faseb J* 21, 3450-3457
- Leitner J, Kuschei W, Grabmeier-Pfistershammer K, Woitek R, Kriehuber E, Majdic O, Zlabinger G, Pickl WF, Steinberger P (2010): T cell stimulator cells, an efficient and versatile cellular system to assess the role of costimulatory ligands in the activation of human T cells. *J Immunol Methods* 362, 131-141

- Li S, Wang W, Hu X, Ren L, Yin H, Yang X, Liu H, Zhang X (2011): The effects of early rapid corticosteroid reduction on cell-mediated immunity in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol* 24, 127-130
- Liu H, Hu B, Xu D, Liew FY (2003): CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4. *J Immunol* 171, 5012-5017
- Liu J, Lluís A, Illi S, Layland L, Olek S, von Mutius E, Schaub B (2010): T regulatory cells in cord blood--FOXP3 demethylation as reliable quantitative marker. *PLoS One* 5, e13267
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St (2006): CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203, 1701-1711
- Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS (2002): Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169, 2756-2761
- Ljunggren HG, Karre K (1990): In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11, 237-244
- Loftus EV, Jr. (2004): Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126, 1504-1517
- Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Sawada T, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Watanabe M (2004): CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J Immunol* 173, 3119-3130
- Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L (2002): CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 17, 167-178
- Manel N, Unutmaz D, Littman DR (2008): The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol* 9, 641-649
- Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD, Levine SS, Fraenkel E, von Boehmer H, Young RA (2007): Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 445, 931-935
- Matricon J, Barnich N, Ardid D (2010): Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonself* 1, 299-309
- Maul J (2005): Peripheral and Intestinal Regulatory CD4+CD25 T Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 128, 1868-1878
- Mayer CT, Floess S, Baru AM, Lahl K, Huehn J, Sparwasser T (2011): CD8+ Foxp3+ T cells share developmental and phenotypic features with classical CD4+ Foxp3+ regulatory T cells but lack potent suppressive activity. *Eur J Immunol* 41, 716-725

- McGovern D, Powrie F (2007): The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut* 56, 1333-1336
- Mendler M, Kwok H, Franco E, Baron P, Weissman J, Ojogho O (2008): Monitoring peripheral blood CD4+ adenosine triphosphate activity in a liver transplant cohort: insight into the interplay between hepatitis C virus infection and cellular immunity. *Liver Transpl* 14, 1313-1322
- Mesquita Junior D, Araujo JA, Catelan TT, Souza AW, Cruvinel Wde M, Andrade LE, Silva NP (2010): Immune system - part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Rev Bras Reumatol* 50, 552-580
- Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D (2009): Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30, 899-911
- Moller G (1988): Do suppressor T cells exist? *Scand J Immunol* 27, 247-250
- Monteleone I, Pallone F, Monteleone G (2009): Interleukin-23 and Th17 cells in the control of gut inflammation. *Mediators Inflamm* 2009, 297645
- Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, van der Zanden L, de Vries RR, Huizinga TW (2005): Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 66, 13-20
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357
- Mottet C, Uhlig HH, Powrie F (2003): Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 170, 3939-3943
- Mow WS, Vasiliauskas EA, Lin YC, Fleshner PR, Papadakis KA, Taylor KD, Landers CJ, Abreu-Martin MT, Rotter JI, Yang H (2004): Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 126, 414-424
- Nature 447 (2007): Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447, 661-678
- Ochs HD, Gambineri E, Torgerson TR (2007): IPEX, FOXP3 and regulatory T-cells: a model for autoimmunity. *Immunol Res* 38, 112-121
- Oellerich M, Barten MJ, Armstrong VW (2006): Biomarkers: the link between therapeutic drug monitoring and pharmacodynamics. *Ther Drug Monit* 28, 35-38
- Ogino H, Nakamura K, Ihara E, Akiho H, Takayanagi R (2011): CD4+CD25+ regulatory T cells suppress Th17-responses in an experimental colitis model. *Dig Dis Sci* 56, 376-386
- Oldenhove G, de Heusch M, Urbain-Vansanten G, Urbain J, Maliszewski C, Leo O, Moser M (2003): CD4+ CD25+ regulatory T cells control T helper cell type 1 responses to foreign antigens induced by mature dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 198, 259-266

Olek A, Oswald J, Walter J (1996): A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res* 24, 5064-5066

Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F (2005): Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 65, 2457-2464

Otley A, Steinhart AH (2005): Budesonide for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 4, CD000296

Parkin J, Cohen B (2001): An overview of the immune system. *Lancet* 357, 1777-1789

Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL (1993): Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 5, 1461-1471

Price CP, Trull AK, Berry D, Gorman EG (1987): Development and validation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay for C-reactive protein. *J Immunol Methods* 99, 205-211

Read S, Malmstrom V, Powrie F (2000): Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192, 295-302

Reinsmoen NL, Cornett KM, Kloehn R, Burnette AD, McHugh L, Flewellen BK, Matas A, Savik K (2008): Pretransplant donor-specific and non-specific immune parameters associated with early acute rejection. *Transplantation* 85, 462-470

Rini C, Jandorf L, Valdimarsdottir H, Brown K, Itzkowitz SH (2008): Distress among inflammatory bowel disease patients at high risk for colorectal cancer: a preliminary investigation of the effects of family history of cancer, disease duration, and perceived social support. *Psychooncology* 17, 354-362

Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF (1998): A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 588-593

Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martinez-Torrecedrada JL, Ling KL, Pratap S, Toms C, Fox BC, Cerundolo V (2005): Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* 35, 1681-1691

Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK (2006): Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212, 28-50

Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA (1986): A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 137, 1270-1274

Sakaguchi S (2004): Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22, 531-562

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (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, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T (2006): Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 212, 8-27
- Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T (2009): Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 21, 1105-1111
- Sanchez-Velasco P, Rodrigo E, Valero R, Ruiz JC, Fernandez-Fresnedo G, Lopez-Hoyos M, Pinera C, Palomar R, Leyva-Cobian F, Arias M (2008): Intracellular ATP concentrations of CD4 cells in kidney transplant patients with and without infection. *Clin Transplant* 22, 55-60
- Sartor RB (2006): Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3, 390-407
- Saruta M, Yu QT, Fleshner PR, Mantel PY, Schmidt-Weber CB, Banham AH, Papadakis KA (2007): Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clin Immunol* 125, 281-290
- Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A (2003): CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 98, 1089-1099
- Schulz-Juergensen S, Burdelski MM, Oellerich M, Brandhorst G (2012): Intracellular ATP production in CD4+ T cells as a predictor for infection and allograft rejection in trough-level guided pediatric liver transplant recipients under calcineurin-inhibitor therapy. *Ther Drug Monit* 34, 4-10
- Schwartz RH (2003): T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21, 305-334
- Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R (2006): Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203, 1693-1700
- Sehouli J, Loddenkemper C, Cornu T, Schwachula T, Hoffmuller U, Grutzkau A, Lohneis P, Dickhaus T, Grone J, Kruschewski M (2011): Epigenetic quantification of tumor-infiltrating T-lymphocytes. *Epigenetics* 6, 236-246
- Shalev I, Selzner N, Shyu W, Grant D, Levy G (2012): The role of Treg in promotion of transplant tolerance. *Liver Transpl* 18, 761-770
- Shevach EM (2002): CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2, 389-400
- Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K (2005): Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 19 Suppl A, 5-36
- Singh B, Read S, Asseman C, Malmstrom V, Mottet C, Stephens LA, Stepankova R, Tlaskalova H, Powrie F (2001): Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev* 182, 190-200
- Snyder FF, Mendelsohn J, Seegmiller JE (1976): Adenosine metabolism in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *J Clin Invest* 58, 654-666

- Sottong PR, Rosebrock JA, Britz JA, Kramer TR (2000): Measurement of T-lymphocyte responses in whole-blood cultures using newly synthesized DNA and ATP. *Clin Diagn Lab Immunol* 7, 307-311
- Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, Barakauskiene A, Villanacci V, Von Herbay A, Warren BF (2006): European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 55 Suppl 1, i1-15
- Stockinger B, Veldhoen M (2007): Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 19, 281-286
- Strauch UG, Obermeier F, Grunwald N, Gurster S, Dunger N, Schultz M, Griese DP, Mahler M, Scholmerich J, Rath HC (2005): Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T cells: lessons from a transfer model of colitis. *Gut* 54, 1546-1552
- Strisciuglio C, van Deventer S (2010): Regulatory T cells as potential targets for immunotherapy in inflammatory bowel disease. *Immunotherapy* 2, 749-752
- Strober W, Fuss I, Mannon P (2007): The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 117, 514-521
- Stutman O (1978): Intrathymic and extrathymic T cell maturation. *Immunol Rev* 42, 138-184
- Takahashi M, Nakamura K, Honda K, Kitamura Y, Mizutani T, Araki Y, Kabemura T, Chijiwa Y, Harada N, Nawata H (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
- Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S (1998): Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10, 1969-1980
- Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S (2000): Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)/CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192, 303-310
- Takeda K, Akira S (2005): Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17: 1-14
- Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, Masteller EL, McDevitt H, Bonyhadi M, Bluestone JA (2004): In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199, 1455-1465
- Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM (2004): CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199, 1467-1477
- Thia KT, Loftus EV, Jr., Sandborn WJ, Yang SK (2008): An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Am J Gastroenterol* 103, 3167-3182
- Thornton AM, Shevach EM (1998): CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188, 287-296

- Tonkin DR, He J, Barbour G, Haskins K (2008): Regulatory T cells prevent transfer of type 1 diabetes in NOD mice only when their antigen is present in vivo. *J Immunol* 181, 4516-4522
- Travis SP, Stange EF, Lemann M, Oresland T, Chowers Y, Forbes A, D'Haens G, Kitis G, Cortot A, Prantera C (2006): European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* 55 Suppl 1, i16-35
- Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, Tannapfel A, Fontenot JD, Ramsdell F, Powrie F (2006): Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol* 177. 5852-5860
- Valencia X, Lipsky PE (2007): CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3, 619-626
- Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA (2004): Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199, 971-979
- Viguier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L (2004): Foxp3 expressing CD4+CD25(high): regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173, 1444-1453
- von Boehmer H (2005): Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6, 338-344
- Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF (2003): Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* 112, 1437-1443
- Walmsley RS, Ayres RC, Pounder RE(1998) : A simple clinical colitis activity index. *Gut* 43, 29-32
- Watts TH (2005): TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* 23, 23-68
- Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM (2006): Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24, 677-688
- Wehkamp J, Stange EF, Fellermann K (2009): Defensin-immunology in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin Biol* 33 Suppl 3, S137-144
- Werner L, Berndt U, Paclik D, Danese S, Schirbel A, Sturm A (2011): TNFalpha inhibitors restrict T cell activation and cycling via Notch-1 signalling in inflammatory bowel disease. *Gut* 61, 1016-1027
- Wieczorek G, Asemissen A, Model F, Turbachova I, Floess S, Liebenberg V, Baron U, Stauch D, Kotsch K, Pratschke J (2009): Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res* 69, 599-608
- Wieland E, Olbricht CJ, Susal C, Gurragehaa P, Bohler T, Israeli M, Sommerer C, Budde K, Hartmann B, Shipkova M, Oellerich M (2010): Biomarkers as a tool for management of immunosuppression in transplant patients. *Ther Drug Monit* 32, 560-572

- Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD (2001): X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27, 18-20
- Wilmanski JM, Petnicki-Ocwieja T, Kobayashi KS (2008): NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases. *J Leukoc Biol* 83, 13-30
- Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S (2008): CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322, 271-275
- Xavier RJ, Podolsky DK (2007): Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448, 427-434
- Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W (2007): Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 178, 6725-6729
- Xue F, Zhang J, Han L, Li Q, Xu N, Zhou T, Xi Z, Wu Y, Xia Q (2010): Immune cell functional assay in monitoring of adult liver transplantation recipients with infection. *Transplantation* 89, 620-626
- Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, Maeda M, Onodera M, Uchiyama T, Fujii S, Sakaguchi S (2004): Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 16, 1643-1656
- Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman RM (2003): Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 198, 235-247
- Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW (2005): ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood* 106, 584-592
- Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, Relling MV, Evans WE (1997): Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* 126, 608-614
- Yu QT, Saruta M, Avanesyan A, Fleshner PR, Banham AH, Papadakis KA (2007): Expression and functional characterization of FOXP3+ CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 13, 191-199
- Zeevi A, Britz JA, Bentlejewski CA, Guaspari D, Tong W, Bond G, Murase N, Harris C, Zak M, Martin D, (2005): Monitoring immune function during tacrolimus tapering in small bowel transplant recipients. *Transpl Immunol* 15, 17-24
- Zheng SG, Wang J, Horwitz DA (2008): Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. *J Immunol* 180, 7112-7116
- Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY (2007): Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445, 936-940
- Zhu J, Paul WE (2008): CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557-1569

Ziegler SF (2006): FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 24, 209-226

Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C, Le Moine A, Brunet LR, Kemeny DM, Bowen G, Rook G, Walker C (2002): Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nat Med* 8, 625-629

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Oellerich für das Ermöglichen dieser Arbeit in der Abteilung Klinische Chemie, für die konstruktiven Denkanstöße und die hervorragende Betreuung als Doktorvater.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich auch Herrn PD Dr. Gunnar Brandhorst für das Überlassen dieses interessanten Themas und die hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit dieser Arbeit aussprechen. Seine ständige Bereitschaft zu fachlicher Hilfe und Diskussionen war für mich von großem Wert.

Ich danke des Weiteren Herrn Dr. Christoph Eberle für seine stetige Unterstützung und fachliche Kompetenz, besonders bei Fragen zur Durchflusszytometrie und Probenaufbereitung.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Zentrallabors der Abteilung Klinische Chemie und besonders Frau Jutta Engelmeyer, Frau Sandra Götze, Herrn Rainer Andag und Frau Christina Wiese für die tatkräftige Unterstützung und Beantwortung meiner Fragen im Labor.

Lebenslauf

Am 21.11.1985 wurde ich in Köln geboren.

Im Alter von 6 Jahren wurde ich eingeschult und besuchte die Grundschule Bad Neuenahr und anschließend das Peter-Joerres-Gymnasium in Bad Neuenahr-Ahrweiler. Dort beendete ich im März 2005 meine Schullaufbahn mit der allgemeinen Hochschulreife nach 12 ½ Jahren.

Vom Mai 2005 bis Januar 2006 leistete ich meinen Zivildienst im Krankenhaus Maria Hilf in Bad Neuenahr für 4 Monate auf einer internistischen und für 5 Monate auf einer urologischen Station in der Pflege ab. Im Zuge des Zivildienstes absolvierte ich eine Ausbildung zum Pflegediensthelfer.

Im Sommersemester 2006 begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen. Dort legte ich den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im März 2008 ab. Vom April 2010 bis August 2011 habe ich als studentische Hilfskraft in der Abteilung Klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen gearbeitet. Im Zuge meines Praktischen Jahres habe ich, neben den Pflichttertialen in der Inneren Medizin und der Chirurgie, das Wahltertial in der Neurologie absolviert.

Im Oktober 2012 habe ich die schriftliche Prüfung und im Dezember 2012 die mündlich-praktische Prüfung des zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung jeweils mit der Note gut bestanden.

Im Rahmen des Studiums habe ich zusätzlich die Grundstufe I und II in Italienisch erlangt.