

**Verstärkung der suppressiven Eigenschaften von
regulatorischen T-Zellen
durch den Alanin-Aminopeptidase-Inhibitor Phebestin
in vitro sowie im DSS-Colitis Modell *in vivo***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.),

genehmigt durch

die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von: Diplom-Biologin Janine Tadge
geb. am: 19.01.1979 in Magdeburg
Gutachter: Dr. rer. nat. habil. Uwe Lendeckel
Prof. Dr. med. Martin Leverkus
Prof. Dr. med. Stephan von Hörsten

Eingereicht am: 22.08.2005

Verteidigung am: 08.06.2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Peptidasen.....	7
1.2 Regulatorische T-Zellen.....	11
1.3 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen.....	14
1.3.1 Definition.....	14
1.3.2 Pathogenese.....	14
1.3.3 Immunregulation bei CED.....	15
1.3.4 Tiermodelle.....	18
1.3.5 Therapie.....	20
2. Zielstellung	22
3. Material und Methoden	24
3.1 Probanden.....	24
3.2 Isolierung mononukleärer Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation.....	24
3.2.1 Positive Selektion von CD25 ⁺ -Zellen mit Micro-Beads.....	25
3.3 Zellkulturen.....	26
3.4 Proliferationsassays.....	27
3.4.1 Ko-Kulturexperimente mit regulatorischen T-Zellen und depletierten MNZ.....	27
3.5 RNA-Isolation.....	28
3.5.1 Isolierung von RNA aus Blutzellen.....	28
3.5.2 Isolierung von RNA aus Darmgewebe.....	28
3.5.3 Isolierung von RNA aus Splenozyten.....	28
3.6 Reverse Transkription.....	29
3.7 Quantitative RT-PCR.....	29
3.8 Bestimmung des TGF-β ₁ -Gehaltes in den Überständen der Zellkulturen.....	32
3.9 Durchflusszytofluorometrie.....	33
3.10 Lyse der Zellen (für Westernblot).....	34
3.11 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	35
3.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	35
3.13 Western Blot-Analyse.....	36
3.13.1 Proteintransfer.....	36
3.13.2 Proteinnachweis mit Antikörpern.....	37
3.14 Versuchstiere.....	38
3.15 Induktion einer experimentellen akuten Colitis mit Dextransulfat (DSS).....	39
3.16 Entnahme und Präparation der Organe.....	39
3.16.1 Blutentnahme.....	40
3.16.2 Plasmagewinnung und Konzentrationsbestimmung.....	40
3.17 Scoring.....	41
3.17.1 Gewichtsveränderung.....	41
3.17.2 Stuhlkonsistenz und Rektal-Blutung.....	41
3.18 Dickdarmlänge.....	41
3.19 Durchführung der Tierversuche.....	42
Behandlung.....	42
3.20 Markierung regulatorischer T-Zellen mit CellTracker Green CMFDA.....	44
3.21 Statistik.....	45
4. Ergebnisse	46
4.1 Auswertung der <i>in vitro</i> Versuche mit humanen regulatorischen T-Zellen.....	46
4.1.1 Steigerung der immunsuppressiven Aktivität humaner CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen durch den Aminopeptidase-Inhibitor Phebestin.....	46

4.1.2 Bestimmung des Effektes des Aminopeptidase-Inhibitors Phebestin auf die Funktion regulatorischer T-Zellen	48
4.1.2.1 Genexpression	48
4.1.2.2 TGF- β_1 -Oberflächenexpression und -Sekretion.....	51
4.1.2.3 Detektion von TGF- β_1 in Zelllysaten mittels Westernblot-Analyse	52
4.1.2.4 Detektion von FOXP3 in Zelllysaten mittels Westernblot-Analyse	54
4.2 Auswertung der Ergebnisse des DSS-Maus-Modells für Colitis ulcerosa <i>in vivo</i>	55
4.2.1 Lokalisierung der regulatorischen T-Zellen im Darm der Colitis-Mäuse mittels CellTracker Green (CMFDA)	55
4.2.2 Injektion von Treg, Phebestin und der Kombination von Treg und Phebestin in DSS-Mäuse.....	56
4.2.2.1 Disease activity index.....	56
4.2.2.2 Untersuchung der Dickdarmlängen der DSS-Mäuse	57
4.2.2.3 Histologie und histologischer Score.....	59
4.2.2.4 Gewichtsveränderungen	60
4.2.2.5 TGF- β_1 mRNA-Expression im Darm und in den Splenozyten der DSS-Mäuse.....	61
4.2.2.6 TGF- β_1 Konzentration im Plasma der DSS-Mäuse.....	63
4.2.2.7 FoxP3 mRNA-Expression im Darm und in den Splenozyten der DSS-Mäuse.....	64
4.2.2.8 IL-10 mRNA-Expression im Darm und in den Splenozyten der DSS-Mäuse.....	66
4.2.2.9 T-bet mRNA-Expression im Darm und in den Splenozyten der DSS-Mäuse.....	68
4.2.3 Wiederholte Injektionen unterschiedlicher Konzentrationen des Inhibitors Phebestin in DSS-Mäuse	71
4.2.3.1 Disease activity index.....	71
4.2.3.2 Gewichtsveränderungen	72
5. Diskussion	73
5.1 Die Rolle von regulatorischen T-Zellen im Immunsystem.....	73
5.2 Suppressive Aktivität von regulatorischen T-Zellen.....	74
5.3 Die Rolle von mAAP und mAAP-Inhibitoren bei Autoimmunerkrankungen.....	75
5.4 Charakterisierung regulatorischer T-Zellen auf mRNA-Ebene	76
5.5 Charakterisierung regulatorischer T-Zellen auf Proteinebene	81
5.6 Die Rolle der regulatorischen T-Zellen in der DSS-induzierten Colitis	82
5.7 Protektive Wirkung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen in einem <i>in vivo</i> Maus Modell für Colitis	84
5.8 mRNA Expression im Darm und in den Splenozyten der DSS-Mäuse	87
5.9 Histologische Untersuchung der Darmschnitte von den DSS-Mäusen.....	89
5.10 Klinische Bedeutung der regulatorischen T-Zellen	90
6. Zusammenfassung.....	92
7. Literaturverzeichnis.....	93
8. Anhang	108
8.1 Eidesstattliche Erklärung.....	108
8.2 Lebenslauf.....	109
8.3 Publikationen.....	110
8.4 Danksagung.....	111

Abkürzungen

Ak	Antikörper
AMV	„avian myeloblastic virus“
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
Aqua deion.	Aqua deionisata
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaar
BCIP	Bromo-chloro-indolyl-phosphattoluidinsalz
CD	„cluster of differentiation“
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
cDNA	„complementary DNA“
CPM	Impulse je Minute („counts per minute“)
Ct	Schwellenwert-PCR-Zyklus („threshold cycle“)
CTLA-4	cytotoxische T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen
DAI	„disease activity index“
DMEM	„Dulbecco´s modified Eagles medium“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DPIV	Dipeptidylpeptidase IV
ds	doppelsträngig
DSS	„dextran sulfat sodium“
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Endkonzentration
FKH	„forkhead DNA-binding domain“
FCS	„fetal calf serum“
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FOXP3	„forkhead box protein 3“ (human)
FoxP3	„forkhead box protein 3“ (Maus)
GALT	„gut associated lymphoid tissue“
GITR	„glucocorticoid-inducible TNF-receptor like molecule“
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
IFN- γ	Interferon γ

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IUBMB	„International Union of Biochemistry and Molecular Biology“
kBp	Kilobase (10 ³ Basenpaare)
kDa	Kilodalton
LAG-3	„lymphocyte activation gene“
mAAP	„membrane alanyl-aminopeptidase“ (Aminopeptidase N)
mAK	monoklonaler Antikörper
MG	Molekulargewicht
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)
MNZ	mononucleäre Zellen
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure (Boten-RNS)
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuche/Tiere
NBT	„nitro blue Tetrazolium“
NK	natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte
PAQ-22	3-(2,6-Diethylphenyl)-2,4 (1H,3H)-Chinazolindion
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin (Lektin aus <i>Phaseolus vulgaris</i>)
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PSA	Puromycin-sensitive Aminopeptidase
PWM	Pokeweed Mitogen (Lektin aus <i>Phytolacca americana</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RSA	Rinderserumalbumin
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	„real time“-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	„sodium dodecyl sulfate“
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
T-bet	„T-box expressed in T cells“

TCR	T-Zell-Rezeptor
TGEV	„transmissible gastroenteritis virus“
TGF- β	„transforming growth factor- β “
T _{H1}	T-Helfer-Zellen vom Typ 1
T _{H2}	T-Helfer-Zellen vom Typ 2
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF- α	„tumor necrosis factor- α “
Treg	natürliche regulatorische T-Zellen (CD4 ⁺ CD25 ⁺)
U/min	Umdrehungen/Minute
Verd.	Verdünnung
zAAP	zytosolische Alanyl-Aminopeptidase
ZZ	Zellzahl

1. Einleitung

1.1 Peptidasen

Peptidasen spielen eine große Rolle bei regulatorischen und metabolischen Stoffwechselfvorgängen. Peptidasen (Kurzform vom Peptidbindungshydrolyasen) gehören einer Gruppe von Enzymen an, die Proteine oder Peptide spalten können. Nach der biochemischen Nomenklatur der „International Union of Biochemistry and Molecular Biology“ (IUBMB) werden die Peptidasen in die Klasse der Hydrolyasen (EC 3) eingeordnet, da sie unter Verbrauch von Wasser Peptidebindungen spalten [1]. Einen Überblick über die Einteilung der Peptidasen gibt die Abbildung 1.

Ektopeptidasen sind membranständig lokalisiert und das katalytische Zentrum befindet sich außerhalb der Zelle. Die meisten Ektopeptidasen gehören zum sogenannten Typ II integraler Membranproteine. Die Verankerung in der Membran erfolgt bei diesem Typ durch eine hydrophobe Aminosäuresequenz nahe dem N-Terminus. Bei dem Typ I integralen Membranproteinen übernimmt eine hydrophobe Aminosäuresequenz nahe dem C-Terminus die Verankerungsfunktion. Der dritte Typ ist durch Verankerung mittels Glykosylphosphatidyl-inositol (GPI) in der Membran gekennzeichnet [2].

Eine Schlüsselfunktion für Entstehung und Verlauf entzündlicher Prozesse und Autoimmunerkrankungen besitzt die Membran-Alanyl-Aminopeptidase (mAAP, APN, CD13, E.C. 3.4.11.2). Es handelt sich um eine Ektopeptidase welche zur Gruppe der Aminopeptidasen (EC 3.4.11) gehört. Die mAAP ist eine Zn^{2+} -abhängige Peptidase (Metalloprotease der Familie M1/Clan MA) und besitzt ein Molekulargewicht von 150 kDa. Sie gehört zu dem Typ II-Transmembranproteinen und besitzt einen Proteinanteil von 967 Aminosäuren, welcher sowohl N- als auch O-glycosyliert ist [3]. Eine Zusammenfassung der geschichtlichen Entwicklung der mAAP gibt die Tabelle 1.

Tabelle. 1: Überblick der Entdeckung und Charakterisierung von mAAP (CD13)

1963	Pfleider, Celliers	erstmalige Isolierung der mAAP aus der Schweineniere [4]
1988	Olsen	Klonierung des humanen mAAP-Gens [5]
1989	Look	mAAP wurde als CD13 identifiziert [6]
1990	Watt, Willard	Lokalisierung des humanen mAAP-Gens auf Chromosom 15(q25-q26) [7]
1996	Lerche	Aufklärung der Exon-Intron-Struktur des humanen mAAP-Gens [8]

Die Kontrolle des mAAP-Gens erfolgt über zwei verschiedene Promotoren in myeloischen bzw. epithelialen Zellen [9]. Im myeloischen Promotor wird die Transkription an einer Gruppe von GC-Boxen etwa 8 kBp vor der kodierenden Sequenz initiiert. Im epithelialen Promotor beginnt die Transkription an einer herkömmlichen TATA-Box unmittelbar vor dem Transkriptionsstart [9]. Die beiden Promotoren unterscheiden sich aufgrund ihrer vorhandenen Bindungsorte für Transkriptionsfaktoren. Bindungsorte für die Transkriptionsfaktoren LF-A1, LF-B1, LF-B2, LF-C wurden im epithelialen Promotor identifiziert [9;10]. Im myeloischen Promotor befinden sich fünf Sp1-, drei ETF- sowie eine Pu-, myb- und AP-2-Konsensus-Sequenzen [9]. Zwischen beiden Promotoren befindet sich eine 300 Bp große Enhancer-Region, die sowohl mit dem myeloischen als auch mit dem epithelialen Promotor interagieren kann [11]. Die Transkripte der beiden Promotoren verschlüsseln das gleiche Protein und unterscheiden sich nur in einer nicht translatierten Region [8]. Ein weiterer, bisher wenig charakterisierter mAAP-Promotor wurde in alveolären Epithelzellen beschrieben [12].

Das Ektoenzym mAAP ist in verschiedenen humanen Geweben wie z.B. Dünndarmepithel und Niere [13] nachweisbar. Weiterhin wurde mAAP auf Zellen des peripheren Nervensystems, der Milz, Lunge, Leber und der Plazenta nachgewiesen [14;15]. Die Expression von Ektopeptidasen im Immunsystem ist differenzierungs- und aktivierungsabhängig. Auf Vorläuferzellen der lymphozytären als auch auf myelo-monozytären Zellen wurde die Zelloberflächen-Expression von mAAP (CD13-Expression) nachgewiesen. Ausgereifte bzw. ruhende Lymphozyten des peripheren Blutes gelten als CD13-negativ [6;16]. In späteren Differenzierungsstadien ist mAAP auch wieder auf Zellen der myelo-monozytären Linie ausgebildet. Im hämatopoetischen System wurde diese Peptidase ausschließlich in myelo-monozytären Zellen, Tumorzellen sowie vereinzelt in malignen Lymphozyten nachgewiesen [6;16]. Somit findet der anti-CD13 monoklonale Antikörper in der Differentialdiagnostik von Leukämien Verwendung [17]. Die Funktion der mAAP ist vielfältig und ist von dem Zelltyp bzw. der Art des Gewebes abhängig. Beteiligt ist mAAP beim Abbau von vorverdauten Nahrungsproteinen zu einzelnen Aminosäuren. mAAP ist außerdem ein Rezeptor für verschiedene Viren wie z.B. für das TGEV (transmissible gastroenteritis virus), welches schwere Gastroenteritiden in Schweinen verursacht, sowie für das humane Coronavirus 229E, welches der Auslöser von Infektionen der oberen Atemwege ist [18]. Neue Untersuchungen weisen darauf hin, dass mAAP in der Angiogenese eine wichtige Rolle spielt [19]. Mehrere Studien haben gezeigt, dass mAAP eine Rolle bei der

Tumormigration und -proliferation spielt. Der mAAP-Inhibitor Bestatin wird als Ubenimex u.a. in der Tumorthherapie von myeloischen Leukämien verwendet [20;21].

Wie bereits erwähnt ist die Expression von mAAP aktivierungsabhängig. Durch eine T-Zell-Aktivierung (PHA/PMA, Concanavalin A) wird die Gen- und Oberflächenexpression dieses Enzyms deutlich erhöht [22]. Dagegen findet man in regulatorischen T-Zellen keine aktivierungsabhängige Induktion der mAAP-Expression, sondern 24 Stunden nach Aktivierung eine stark verminderte Expression [23]. Nicht nur Mitogene wie PHA und PWM tragen zu einer Regulation der CD13-Expression in T-Zellen bei, sondern auch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone. So führen beispielsweise IL-4 und IL-13 zur Induktion der mAAP-Expression [24]. Glukokortikoide regulieren u. a. in Dünndarmepithelzellen und in der fetalen Lunge die mAAP-Expression herauf [25].

Neben der membranständigen Aminopeptidase mAAP existiert die zytosolische Aminopeptidase (PSA, zAAP, E.C. 3.4.11.14), die eine der mAAP sehr ähnliche Substratspezifität besitzt. Sie ist bekannt unter dem Namen Puromycin-sensitive-Aminopeptidase [26] oder Enkepalin-abbauende Aminopeptidase [27;28] und ist vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert. PSA besitzt ein Molekulargewicht von 100 kDa und spaltet bevorzugt basische und hydrophobe Aminosäurereste vom N-terminus suszeptibler Peptide. PSA besitzt eine hohe Sensitivität gegenüber mAAP-Inhibitoren wie z.B. Phebestin und RB3014. Ein Grund dafür könnte sein, dass die membranständige mAAP und die zytosolische Aminopeptidase PSA in ihren katalytischen Motiven eine hohe Ähnlichkeit aufweisen [29].

Die physiologische Rolle der Alanin-Aminopeptidase von Immunzellen ist nicht vollständig bekannt. Um die Wirkungsweise der mAAP im Immunsystem weiter zu erforschen, stehen relativ spezifische Inhibitoren zur Verfügung. Durch Inkubation von T-Zellen mit den Inhibitoren wird die Freisetzung von proliferationshemmenden Peptiden wie zum Beispiel TGF- β_1 induziert. Die Freisetzung des immunsuppressiven Zytokins TGF- β_1 bewirkt eine verminderte Produktion von proinflammatorischen und T-Zell-stimulierenden Zytokinen wie z.B. IL-2, TNF- α und IL-12. Somit resultiert aus der mAAP-Hemmung eine immunsuppressive Wirkung. Aus jüngsten Studien ist bekannt, dass regulatorische CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (Treg) für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Immuntoleranz eine wichtige Rolle spielen. Diese Zellen sind gekennzeichnet durch eine starke mAAP-Expression im Vergleich zu anderen Lymphozyten. Die Aktivierung (z.B. mit PHA/PMA) von regulatorischen T-Zellen führt zu einer Abnahme der mAAP-Expression [23]. Vor

diesem Hintergrund ist zu untersuchen, ob Treg ein Haupttarget von mAAP-Inhibitoren darstellen und ob die durch mAAP-Inhibitoren erzielten immunsuppressiven Effekte durch die Modulation der Funktion und Expression von Treg realisiert werden. Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapieformen gegen Autoimmunerkrankungen ist der Untersuchung von mAAP-Inhibitoren *in vitro* und *in vivo* besondere Bedeutung zuzumessen.

Für die *in vitro* und *in vivo* Versuche der vorliegenden Arbeit wurde der Aminopeptidase-Inhibitor Phebestin verwendet. Phebestin wurde 1996 von Nagai und seinen Mitarbeitern beschrieben [30]. Er besitzt im Vergleich zu anderen Inhibitoren, wie z.B. Bestatin eine höhere Spezifität gegenüber der mAAP. Jedoch ist Phebestin nicht in der Lage, zwischen der membranständigen und der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase (zAAP) zu unterscheiden und hemmt somit beide Peptidasen. Für die Inhibierung der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase wurde der spezifischer Inhibitor PAQ-22 entwickelt [31].

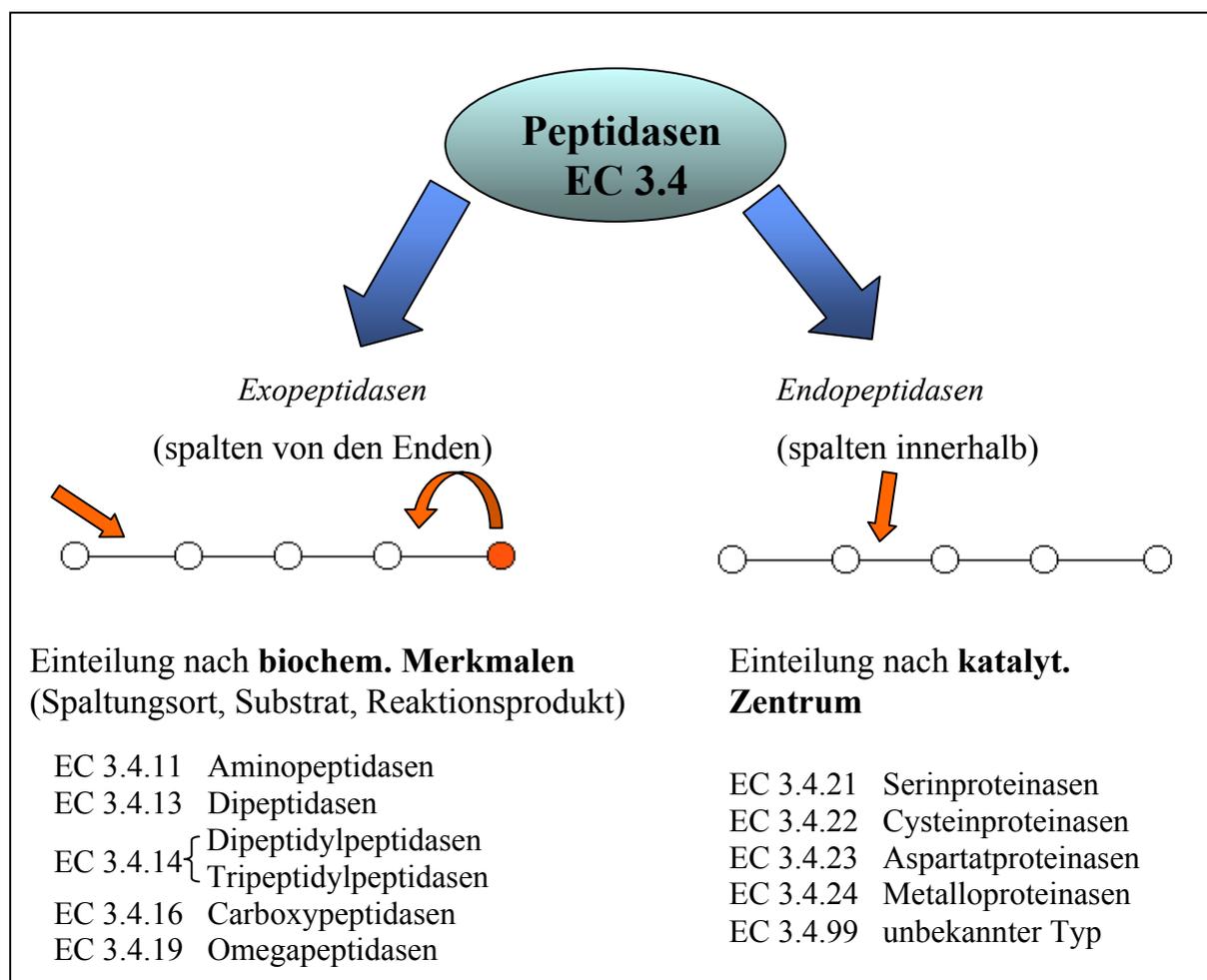


Abb. 1: Systematik der Peptidasen nach der IUBMB (modifiziert nach [32])

1.2 Regulatorische T-Zellen

In den letzten Jahren rückten die regulatorischen T-Zellen immer mehr in das Interesse der Wissenschaftler. Sakaguchi et al. beschrieb als erster die $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen, welche die Fähigkeit besitzen, pathogene T-Zell-Antworten zu kontrollieren [33]. Treg differenzieren sich im Thymus und werden dann in die Peripherie exportiert, wo die Hauptaufgabe darin besteht, die Effektor-Funktion von autoreaktiven reifen T-Zellen zu blockieren [33;34]. Die Entfernung des Thymus am neonatalem Tag 3 und damit verbunden die Eliminierung der $CD4^+CD25^+$ T-Zellpopulation, führt zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wie Gastritis, Thyroiditis und Diabetes [35;36]. Durch den Transfer von $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen kann die Entstehung einer Autoimmunpathologie verhindert werden [37].

Im peripheren Blut sind ca. 5-10 % der zirkulierenden $CD4^+$ T-Zellen zur Klasse der regulatorischen T-Zellen, welche konstitutiv CD25 (Interleukin-2 Rezeptor- α -Kette) auf ihrer Oberfläche exprimieren, zu zählen [33;38]. Regulatorische T-Zellen sind durch ihr Zytokinprofil gekennzeichnet. Sie exprimieren große Mengen IL-10 und TGF- β_1 , moderate Mengen IFN- γ und IL-5 und kein IL-4 oder IL-2 [39]. Ein weiterer charakteristischer Faktor von Treg ist die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 [40-42]. FOXP3 ist ein Transkriptionsfaktor der "forkhead" Familie, welcher essentiell an der Bildung von Treg beteiligt ist. Mutationen im FOXP3-Gen führen sowohl beim Menschen (X-linked syndrom), als auch im Tiermodell zum Auftreten von Autoimmunerkrankungen [41;42]. In der Literatur und auch in eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass CD25-negative T-Zellen einen ungefähr 100fach geringeren FOXP3-mRNA Level besitzen als $CD4^+CD25^+$ T-Zellen [42]. Weiterhin wurde in der Literatur beschrieben, dass TGF- β_1 die Genexpression von FOXP3 in naiven $CD4^+CD25^-$ T-Zellen induziert und somit die regulatorischen Eigenschaften verändert [43]. Verschiedene Subtypen von regulatorischen T-Zellen wurden bereits gefunden und charakterisiert, wobei die Abgrenzung nicht immer eindeutig ist [44]. Ungeklärt sind dabei die Fragen, ob und inwieweit diese Zellen auseinander hervorgehen oder ineinander übergehen können. In Tabelle 2 sind die wichtigsten Populationen von $CD4$ regulatorischen T-Zellen zusammengefasst.

Tabelle 2: CD4 regulatorische T-Zellen

<p>1. $CD4^+ CD25^+$ regulatorische T-Zellen (natürliche regulatorische T-Zellen)</p> <ul style="list-style-type: none"> - gekennzeichnet durch die $CD4^+CD25^+$ Expression - entstehen im Thymus und werden in die Peripherie exportiert - inhibieren Effektor-Zellen, abhängig vom Zell-Zell-Kontakt - charakterisiert durch die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 [40-42]
<p>2. T_H3 regulatorische T-Zellen</p> <ul style="list-style-type: none"> - werden durch orale Zufuhr eines Antigens induziert - Markerzytokin ist TGF-β, aber auch Produktion von IL-10 und IL-4 [44]
<p>3. $Tr1$ regulatorische T-Zellen (Typ1)</p> <ul style="list-style-type: none"> - entstehen unter bestimmten Zellkulturbedingungen, z.B. unter Zugabe von IL-10 oder Vitamin D3 und Dexamethason [39] - werden induziert, wenn das entsprechende Antigen von unreifen Dendritischen-Zellen präsentiert wird - Markerzytokin ist IL-10, des weiteren Produktion von TGF-β und IFN-γ [39] - proliferieren nur äußerst schwach
<p>4. Anergie T-Zellen</p> <ul style="list-style-type: none"> - Antigen-spezifische-Immunregulation wird über APC erreicht - entstehen, wenn Antigen ohne ausreichende Kostimulation präsentiert werden - können T-Zell-aktivierende Funktion von APC hemmen [44]

Die Arbeitsgruppe von A. Hamann beschrieb $\alpha_E\beta_7$ (Integrin) als einen Marker für die effektivste Subpopulation der regulatorischen T-Zellen. Die starke suppressive-Aktivität der $\alpha_E^+ CD25^+$ Zellen konnte bereits im Tiermodell nachgewiesen werden [45].

Zell-Zell-Kontakt zwischen Treg und Effektor-Zellen ist essential für die suppressive-Funktion der regulatorischen T-Zellen [34;46;47]. Dabei spielt die Existenz von Oberflächenmolekülen (wie z.B. CTLA-4) eine entscheidende Rolle. Die Blockierung von CTLA-4 hat den Verlust der suppressiven-Aktivität der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen zur Folge [37;48]. Der Mechanismus der Suppression wird in der Literatur kontrovers diskutiert [49]. Es wurde die Interaktion immunsuppressiver Zytokine wie TGF- β_1 und IL-10 diskutiert [50], in den meisten *in vitro* Studien wurde aber gezeigt, dass die suppressive-Funktion von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen unabhängig von der IL-10 Freisetzung ist [34;51;52]. Auch zur Wirkungsweise des TGF- β_1 auf den regulatorischen T-Zellen gibt es widersprüchliche Meinungen. Die meisten Daten aus der Literatur zeigen jedoch, dass sowohl membranständiges als auch lösliches TGF- β_1 zur Inhibierung autoreaktiver T-Zellen beitragen kann (Abb. 2).

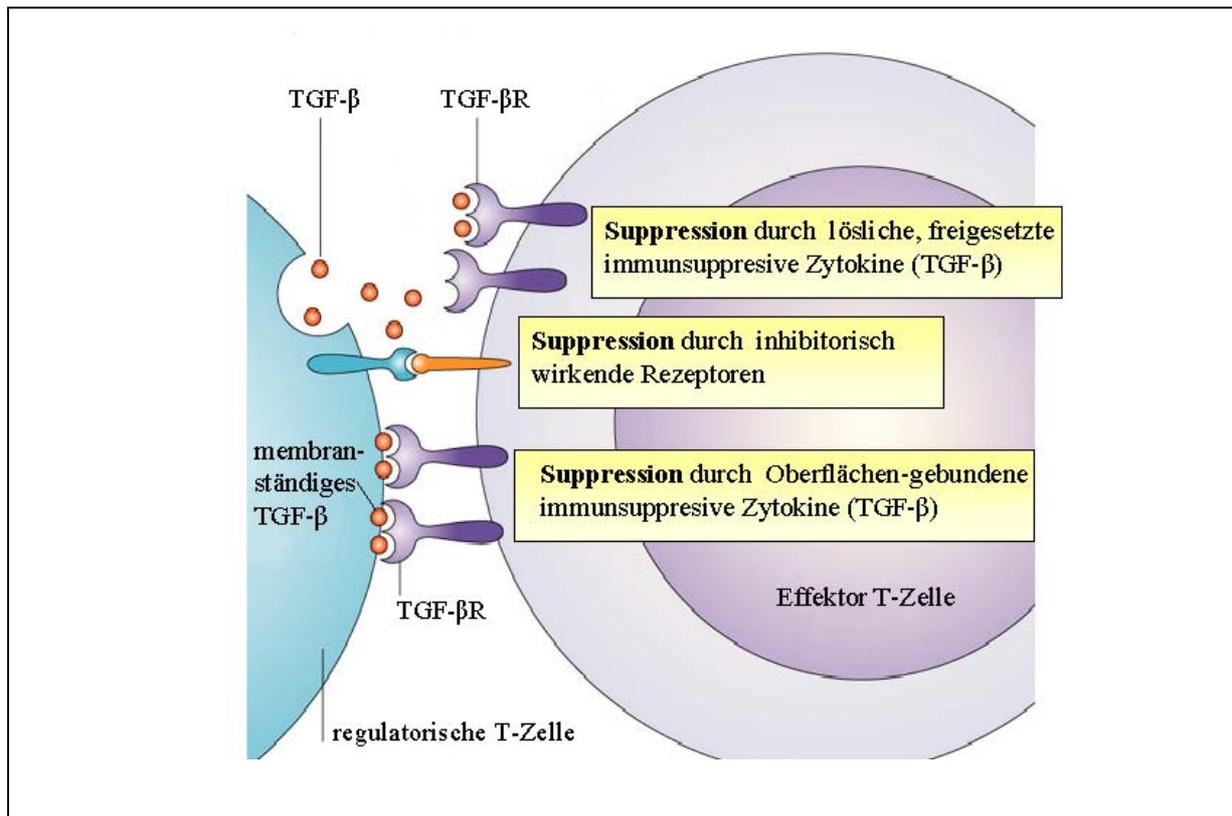


Abb. 2: Inhibierungsmechanismen von regulatorischen T-Zellen (modifiziert nach [53])

Über einen Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Mechanismus (APC, Dendritische Zellen) bindet das membranständige TGF- β_1 der regulatorischen T-Zelle an den TGF- β -Rezeptor (TGF- β R) der autoreaktiven T-Zelle, so dass diese Zelle inhibiert wird. Eine weitere Möglichkeit ist, dass Treg über den TGF- β_1 -TGF- β -Rezeptor an APC binden und dadurch die Eigenschaft der APC so verändern, dass eine Aktivierung von nachfolgend bindenden autoreaktiven T-Zellen verhindert wird (Anergie). Auch eine Inhibierung der autoreaktiven Zelle und APC über lösliches TGF- β_1 kann stattfinden [54].

Die unterschiedlichen Daten können in der Tatsache begründet sein, dass verschiedene regulatorisch wirkende Zellpopulationen existieren, welche bisher nicht eindeutig durch spezifische Marker identifiziert werden können, aber durch eine unterschiedliche Entwicklung und Wirkungsweise gekennzeichnet sind.

Es wurde mehrfach gezeigt, dass regulatorische T-Zellen in Ko-Kulturrexperimenten die Antwort von anderen Zellpopulationen supprimieren. Treg können sowohl aktivierte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen als auch B-Lymphozyten in ihrer Proliferation und Funktion unterdrücken [52;55;56].

Phänotypische Marker der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen sind CD45RB (Maus), CD45RO (Human) bzw. CD45RC (Ratte), L-Selektin (CD62L), CTLA-4 (CD152) und GITR [33;57;58].

CD45RB ist die niedermolekulare Isoform von CD45, welche auf Gedächtnis-T-Zellen exprimiert wird. CTLA-4 ist ein negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung [37]. Wie bereits erwähnt führt der Einsatz des anti-CTLA-4 Antikörpers zum Verlust der suppressiven-Aktivität der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen [37;48]. Regulatorische T-Zellen scheinen eine wesentliche Rolle für den Erhalt und möglicherweise auch für die Induktion der Toleranz zu spielen.

1.3 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

1.3.1 Definition

Unter dem Begriff chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) versteht man schubweise verlaufende, chronisch-inflammatorische Veränderungen des Gastrointestinaltraktes unbekannter Ätiologie. Dabei stellen der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa die beiden klinisch-histologisch definierten Hauptformen dar. Es gibt Hinweise, dass Umwelt-, immunologische und genetische Faktoren eine Rolle spielen. Zu den Umwelt-Faktoren zählen u.a. Rauchen, Ernährung, Hygiene, Klima, Umweltverschmutzung und Stress [59]. Das Auftreten der CED ist weltweit verbreitet, jedoch nimmt die Prävalenz in den Industrieländern mit zunehmenden Lebensstandard zu.

1.3.2 Pathogenese

Der Morbus Crohn ist durch Entzündungsprozesse der Lamina propria aller Darmwandschichten gekennzeichnet und kann von Mundhöhle bis Darmausgang reichen. Histologisch finden sich massive Infiltrate mononukleärer Zellen in allen Schichten der Darmwand (Abb. 3). Im Gegensatz dazu befällt die Colitis ulcerosa ausschließlich den Dickdarm (Colon) und beschränkt sich meist nur auf die Mukosa.

Beide Formen der CED sind durch Diarrhoe und abdominelle Schmerzen gekennzeichnet, die zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Lebensqualität führen. Des weiteren kann es durch die gestörte Darmfunktion zu Mangelzuständen insbesondere an Vitaminen, Spurenelementen, Eiweiß und Flüssigkeit kommen. Die mikrobielle Population des Darmtraktes setzt sich aus mehr als 400 verschiedenen Bakterienspezies zusammen und wird als physiologische Darmflora bezeichnet [60].

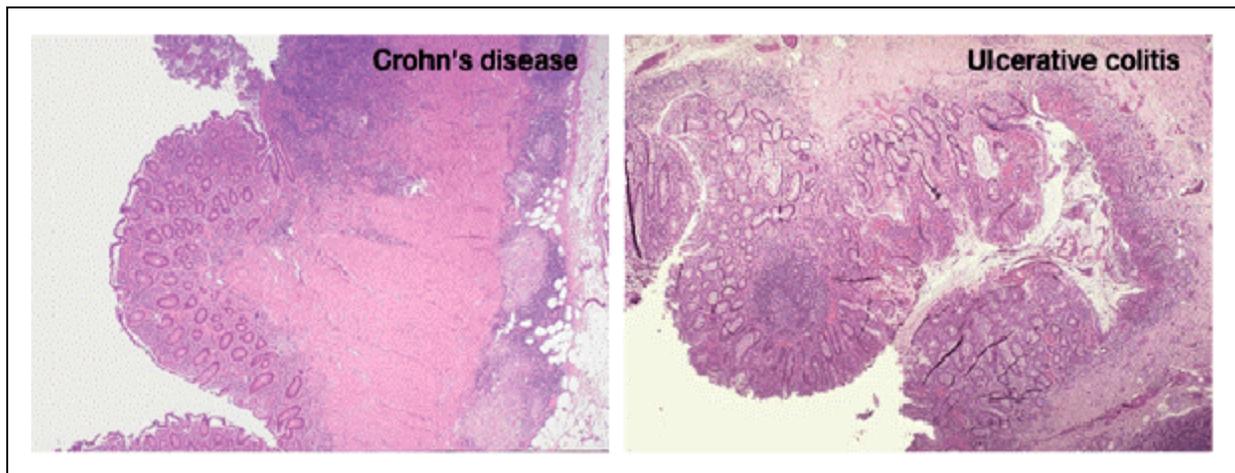


Abb. 3: Histologie von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa [61]

Morbus Crohn: dichte Infiltration der Lymphozyten und Makrophagen (Inflammationen betreffen alle Schichten der Darmwand), Granulome bei ca. 60 % der Patienten, Rissbildung, Ulzeration und submukosale Fibrose (links)

Colitis ulcerosa: Inflammatorische Affekte der oberflächlichen Schichten mit Infiltration der Lymphozyten, Makrophagen und Verlust der Becherzellen, Krypten Abszesse (rechts)

Die Zusammensetzung der Darmflora ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie dem Alter und dem Ernährungsstatus.

Zahlreiche Hinweise deuten daraufhin, dass für die Auslösung des Entzündungsprozesses bei CED ein bakterieller Einfluss beteiligt ist. So ist z.B. die Beobachtung gemacht worden, dass fast alle Tiermodelle in keimfreier Umgebung versagen [62]. Ergebnisse aus einem transgenen Rattenmodell zeigten, dass vor allem anaerobe Bakterien an der Entstehung der CED beteiligt sind [63].

1.3.3 Immunregulation bei CED

Neben dem systemischen Immunsystem stellt das darmassoziierte-lymphatische Gewebe (GALT= *Gut Associated Lymphoid Tissue*) ein immunologisches Kompartiment ähnlicher Größe und Komplexität dar. Es kann in drei funktionelle Bereiche unterteilt werden:

- (1) organisierte lymphatische Gewebe (subepitheliale-lymphatische Follikel, Peyer'sche Plaques, mesenteriale Lymphknoten, Appendix)
- (2) freie lymphatische Zellen der Lamina propria
- (3) intraepitheliale Lymphozyten

Etwa ein Drittel der Zellen, die in der Lamina propria vorkommen, sind T-Zellen. Die phenotypische Verteilung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ähnelt der des peripheren Blutes. Die wichtigste Funktion des GALT ist die vollständige Ausgrenzung von infektiösen- und toxischen Pathogenen, gleichzeitig werden apathogene Mikroorganismen der Darmflora toleriert. Es muss somit einen regulatorischen Mechanismus geben, der eine überschießende Immunreaktion verhindern und dennoch die Bereitschaft zur schnellen, adäquaten Immunantwort aufrecht erhalten kann.

Bei einer normalen Immunantwort werden zu Beginn luminale Antigene (Nahrung, Bakterien) über die Microfold-Zellen ("M") durch Transzytose aufgenommen und in die Peyer'schen Plaques (Follikel) transportiert. Dort findet eine Aktivierung der T- und B-Lymphozyten durch die luminalen Antigene über antigenpräsentierende-Zellen statt. Einige dieser aktivierten Lymphozyten wandern in die Zirkulation und gelangen über die Expression von Adhäsionsmolekülen in die Lamina propria des Darms [64]. Die präaktivierten T-Lymphozyten der Lamina propria übernehmen wichtige regulatorische- und effektorische-Funktionen [65]. Die Sekretion von Zytokinen spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Die T-Lymphozyten werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Zytokinfreisetzung in verschiedene Klassen eingeteilt.

T_H1-Zellen sind durch Aktivierung zytotoxischer T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten für die Abwehr intrazellulärer Erreger (Viren, intrazellulär persistierende Bakterien) und entarteter Zellen wichtig. T_H1-Zytokine, welche von den Entzündungszellen exprimiert werden sind IFN- γ , IL-2 und IL-12. Studien ergaben für den Morbus Crohn eine Beteiligung der Zytokine des T_H1-Typ [66]. T_H2-Zellen unterstützen dagegen die humorale Immunantwort mit Antikörperbildung. T_H2-Zytokine wie IL-4, IL5 und IL-10 spielen möglicherweise eine größere Rolle bei der Colitis ulcerosa. Jedoch findet man in der Literatur dazu widersprüchliche Ergebnisse. Es wurde gezeigt, dass Makrophagen von Patienten mit CED eine Resistenz gegen die „downregulierende“ Funktion von IL-4 aufweisen [67]. T_H3-Zellen begünstigen eine anti-inflammatorische, Toleranz-induzierende Immunantwort.

Experimentelle Daten lassen vermuten, dass eine Störung der intestinalen Immunregulation ein wichtiger Pathogenitätsfaktor bei der Entstehung von CED ist. Somit ist es möglich, dass lokale Toleranzmechanismen gegenüber luminären Antigenen sowie Komponenten der physiologischen bakteriellen Darmflora beeinträchtigt sind [68] (Abb. 4). Für die Steuerung des intestinalen Entzündungsgeschehens sind die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α von großer Bedeutung. Diese Zytokine werden im wesentlichen von

Makrophagen und neutrophilen Granulozyten produziert. Zu den entzündungshemmenden Mediatoren zählen IL-1ra (IL-1-Rezeptorantagonist), IL-10, TGF- β , IL-4 und IL-13. Eine Beteiligung von TGF- β und IL-4 wurde bei der Induktion von IgA, welches die protektive mukosale Immunität wesentlich vermittelt, in Tiermodellen nachgewiesen [69]. Ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-entzündlichen Mediatoren führt zur intestinalen Entzündung. Die Regulation dieser Vorgänge wird durch ein komplexes Netzwerk intrazellulärer Signalmechanismen vermittelt. Die pro-inflammatorischen Zytokine vermitteln zahlreiche Effekte: Aktivierung von T- und B- Zellen, Veränderung der Gefäßpermeabilität, lokale Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen, von Sauerstoffradikalen und Stickoxiden sowie Induktion von Adhäsionsmolekülen, um nur einige zu nennen. Bei CED konnte eine abnorm gesteigerte Permeabilität für Makromoleküle nachgewiesen werden, dies wiederum beeinträchtigt die lokalen Toleranzmechanismen. Durch die Einwirkung von pro-inflammatorischen Zytokinen, werden auf der Oberfläche von Leukozyten und Endothelzellen Adhäsionsmoleküle wie z.B. ICAM-1 (CD54) und Selektine (CD62E, CD62P) exprimiert. Durch sie wird die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und anderen zirkulierenden Blutzellen am Gefäßendothel vermittelt. Die Fließgeschwindigkeit der zirkulierenden Leukozyten wird verlangsamt, sodass das Anheften an die Gefäßwand und die Migration der Leukozyten in das umliegende Gewebe stattfindet.

Bei Patienten mit CED ist das Gleichgewicht zwischen den krankheitsinduzierenden autoreaktiven T-Zellen und den regulatorischen T-Zellen gestört. Dies äußert sich in einer ungleichen Freisetzung von anti- und pro-inflammatorischen Zytokinen. Der Einsatz von mAAP-Inhibitoren bei CED könnte durch die Stärkung der suppressiven Eigenschaften der Treg eine erfolgsversprechende Behandlungsmöglichkeit darstellen.

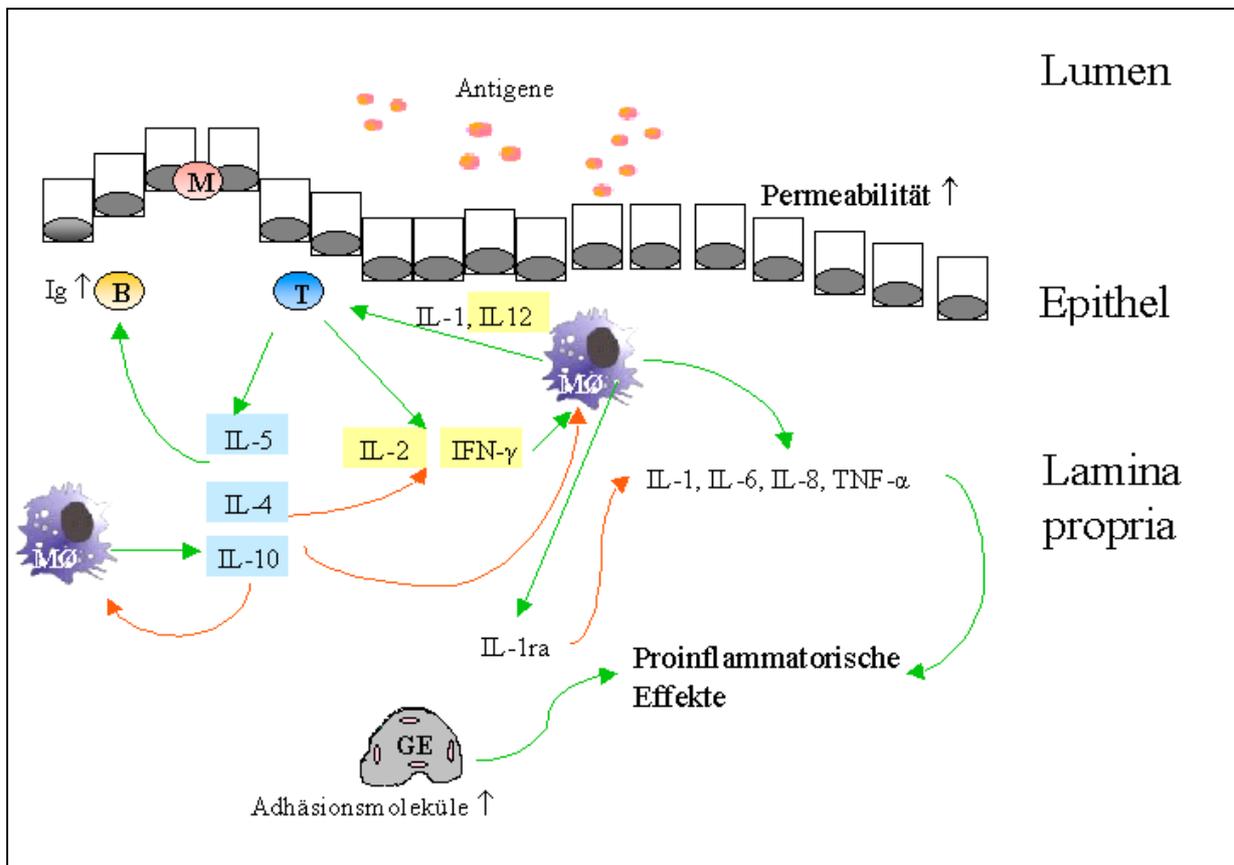


Abb. 4: Immunaktivierung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (modifiziert nach [68])

grüner Pfeil = Zytokinproduktion und stimulierender Einfluss, roter Pfeil = inhibitorische Wirkung; MØ = Makrophage; T = T-Zelle; B = B-Zelle; M = Microfold-Zellen; GE = Gefäßepithel; Ig = Immunglobulin; IL = Interleukin; IL-1ra = IL-1-Rezeptorantagonist
Typische T_H1 -Zytokine (gelb unterlegt), typische T_H2 -Zytokine (blau unterlegt)

1.3.4 Tiermodelle

In den vergangenen Jahren wurden viele neue Tiermodelle der CED beschrieben, welche einen wichtigen Fortschritt bei der Aufklärung der CED darstellen. Die Tabelle 3 zeigt eine Übersicht einiger derzeit publizierter Modelle für CED.

Die Modelle werden in chemisch induzierte, genetisch manipulierte, Zelltransfer- und spontan auftretende Modelle eingeteilt. Ein ideales Tiermodell chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sollte den pathophysiologischen Zustand der menschlichen Darmentzündung so exakt wie möglich widerspiegeln, sodass Rückschlüsse auf Mediatoren der Entzündung sowie immunologische und genetische Grundlagen gemacht werden können.

Das Dextransulfat (DSS) -Modell der Maus kommt den morphologischen Veränderungen, welche im Menschen bei der Colitis Ulcerosa auftreten, schon sehr nahe. Deshalb wurde es für die Versuche, welche im Rahmen dieser Arbeit diskutiert werden, gewählt. Dieses Modell

ist dadurch gekennzeichnet, dass dem Trinkwasser das sulfatierte Polysaccharid Dextran-sulfat zugesetzt wurde. Durch unterschiedlich lange Zyklen bzw. Zeiträume der Behandlung kann eine akute- bzw. chronische Form der Colitis induziert werden. Histologisch ist dieses Modell gekennzeichnet durch Infiltrationen polymorphkerniger Leukozyten, Erosionen, Dysplasien, Verluste von Becherzellen und Krypten, Schädigung von Epithelzellen, Ulzerationen und eine Ausbildung von Lymphfollikeln [70].

Die Colitis der DSS-Maus wie auch die anderen Colitis Modelle tragen zur Entwicklung neuartiger Therapiekonzepte zur Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten von CED maßgeblich bei.

Einige Arbeitsgruppen zeigten, dass schwer immundefiziente SCID-Mäuse durch den adoptiven Transfer von $CD4^+CD25^-$ -Effektor T-Zellen Colitis entwickeln [71;72]. Der Ko-Transfer von einer gleichen Anzahl an $CD4^+CD25^+$ T-Zellen schützt vor der Entwicklung einer Colitis. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Injektion von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen aus gesunden Mäusen die Erkrankung heilen kann. Dieser therapeutische Effekt der regulatorischen T-Zellen wird durch die Gabe von anti-IL-10, anti-TGF- β , und anti-CTLA-4 aufgehoben [72].

An immunkompetenten Tieren sind solche Untersuchungen zur Prävention bzw. Therapie der Colitis mit Treg bislang nicht gezeigt worden.

Tabelle 3. Tiermodelle der CED

<i>Ätiologie</i>	<i>Besonderheiten</i>	<i>Beispiele</i>
Chemisch-induzierte Modelle	<ul style="list-style-type: none"> - Ausbildung ähnlicher Symptome wie bei der Colitis Ulcerosa des Menschen - gute Reproduzierbarkeit - einfache Verfügbarkeit - Erkenntnisse über die Spätphase der Entzündung 	<ul style="list-style-type: none"> - DSS (dextran sulfate sodium)-induzierte Colitis [70] - TNBS (trinitrobenzene sulfonic acid)-induzierte Colitis [73] - Oxazolone induzierte Colitis [73]
Genetisch-manipulierte Modelle	<ul style="list-style-type: none"> - Modelle mit Störungen des komplexen Zytokin-Gleichgewichtes 	<ul style="list-style-type: none"> - Interleukin-2 defiziente Maus [74] - Interleukin-10 defiziente Maus [75] - Interleukin-2ra defiziente Maus [76] - CRFB4 defiziente Maus [77] - T-Zell-Rezeptor α-Kette defiziente Maus [78]
Zelltransfer-Modelle	<ul style="list-style-type: none"> - Spender- und Empfänger-tier notwendig 	<ul style="list-style-type: none"> - CD45RB^{high}-Transfer in Prkdc^{scid}-Mäuse [79] - Knochenmark-Transfer in transgene ϵ26-Mäuse [80]
spontan auftretende Modelle	<ul style="list-style-type: none"> - von Umweltfaktoren abhängig - kein schubweiser Verlauf 	<ul style="list-style-type: none"> - SAMP1/Yit-Maus [81] - C3H/HeJ-Maus [82]

1.3.5 Therapie

Trotz zahlreicher neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse beruht die Behandlung der CED meist auf einer unspezifischen Hemmung der Entzündungsreaktion. Als starke anti-inflammatorische Agenzien werden Glucocorticoide eingesetzt. Außerdem stehen die Immunsuppressiva Azathioprin und Methotrexat in bestimmten Therapiefällen zur Verfügung [83]. Ernährungstherapien bei Colitis ulcerosa erwiesen sich als weitgehend wirkungslos [84].

Für spezifischere Therapien sind *Infliximab*, ein gegen den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) gerichteter Antikörper, und Interleukin-10 einsetzbar [85]. Forschungsergebnisse von Wissenschaftlern der Universität Bristol (England) zeigen das *Basiliximab* eine neue Behandlungsmöglichkeit gegen Colitis ulcerosa darstellt. *Basiliximab* stellt einen chimärisierten monoklonalen Antikörper dar, welcher gegen den Interleukin-2 Rezeptor auf der Oberfläche von aktivierten T-Lymphozyten gerichtet ist [86].

Versuche mit BALB/c-Mäusen im DSS-induzierten Colitis-Modell wurden verschiedene Antibiotika untersucht. Metronidazol wirkte präventiv vor Gabe von DSS, es konnte jedoch eine bereits durch DSS-induzierte Colitis nicht heilen. Die Kombination aus den beiden Breitspektrumantibiotika Vancomycin und Imipenem zeigte sowohl bei der Prävention als auch in der Heilung der Colitis einen positiven Effekt [87]. Eine protektive Wirkung wurde durch die Kombination von Metronidazol und Ciprofloxacin bei der akuten DSS-induzierten Colitis beschrieben [88;89].

2. Zielstellung

Da Ergebnisse aus den letzten Jahren zeigten, dass effektive Amino-peptidase-Inhibitoren wie Phebestin, RB3014, PAQ-22 und Bestatin entscheidenden Einfluss auf die Proliferation, Produktion von Zytokinen, Gen- und Oberflächenexpression (z.B. TGF- β_1) und auf die Funktion von T-Zellen nehmen, war es ein Ziel, den Einfluss des Amino-peptidase-Inhibitors Phebestin auf regulatorischen T-Zellen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, zu untersuchen. Bereits bekannte Ergebnisse aus vorangegangenen Experimenten mit regulatorischen T-Zellen und deren Erkenntnisse wurden als Grundlage verwendet. Es wurde bereits im humanen *in vitro* Modell von regulatorischen T-Zellen gezeigt, dass immunsuppressiven Zytokinen wie TGF- β_1 und IL-10 eine bedeutende Rolle für die Immuntoleranz zukommt. Im Vergleich zu T-Zellen exprimieren ruhende regulatorische T-Zellen wesentlich mehr TGF- β_1 und IL-10. Eine Aktivierung der Treg führt zu einer deutlichen Reduktion der TGF- β_1 -Expression. Dieser Effekt kann mit Amino-peptidase-Inhibitoren wieder aufgehoben werden und führt sogar zu einer extremen Steigerung der TGF- β_1 Expression. Aufgrund der sehr starken mAAP-Expression in Treg und der Beeinflussung der Expression und Funktion von Treg durch spezifische mAAP-Inhibitoren liegt es nahe, die regulatorischen T-Zellen als ein Target von den Amino-peptidase-Inhibitoren zu bezeichnen [23]. Weiterhin wurde die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 untersucht. Ergebnisse der letzten Jahre zeigen das FOXP3 für die Entwicklung und funktionelle Aktivität von regulatorischen T-Zellen sehr wichtig ist [23;40-42;90].

Zur Untersuchung der suppressiven Aktivität der regulatorischen T-Zellen wurden *in vitro* Ko-Kulturversuche mit depletierten MNZ durchgeführt. Damit wurden die suppressiven Eigenschaften der regulatorischen T-Zellen bestätigt. Der Effekt von Phebestin auf die Funktion der Treg wurde in Ko-Kulturversuchen ebenfalls untersucht. Aufgrund der erhaltenen Daten aus *in vitro*-Experimenten, welche die stabilisierenden bzw. stärkenden Eigenschaft von Phebestin auf Treg belegten, war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit die Verifizierung der Wirkung von Phebestin *in vivo*. Als *in vivo* Modell wurde das Dextran-Sulfat-induzierte Colitis-Maus-Modell verwendet. Dazu wurden regulatorische T-Zellen gesunder Mäuse in DSS-Mäuse injiziert. Um die Rolle der regulatorischen T-Zellen im untersuchten Tiermodell besser zu verstehen, wurden die Genexpressionen, der an der Entzündungsreaktion beteiligten Zytokine, untersucht.

Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Medikamente und Therapieformen gegen Auto-immunerkrankungen und inflammatorischen Erkrankungen, wie z.B. inflammatorische

Darmerkrankungen (IBD) war die Gabe des Alanyl-Aminopeptidase-Inhibitors Phebestin, einzeln und als kombinierte Zelltherapie mit CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, ein wichtiger Schritt.

3. Material und Methoden

Im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit wurden Versuche mit humanen regulatorischen T-Zellen durchgeführt. Diese Versuche stellen die Grundlage zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Effekte von mAAP-Inhibitoren auf die T-Zell-Funktion, insbesondere Treg, dar.

In einem zweiten Teil wurden an einem Colitis-DSS-Modell mehrere Versuche durchgeführt, welche eine Grundlage für spätere Therapiemöglichkeiten der Colitis ulcerosa im Menschen darstellen können.

3.1 Probanden

Die Gewinnung des humanen Blutes erfolgte durch Venenpunktion von freiwilligen Probanden. Alle Probanden waren volljährig und gesund. Es liegt eine schriftliche Einwilligung der Blutspender, sowie eine Erklärung, dass sie über Risiken und Verwendungszwecke aufgeklärt wurden, vor.

3.2 Isolierung mononukleärer Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation

Als Ausgangsmaterial wurde peripheres Blut verwendet, welches mit einem sterilen Heparin/RPMI 1640 (PAA Laboratories)-Gemisch zur Gerinnungshemmung versetzt wurde (200 ml Blut, 100 ml Gemisch).

In 50 ml Falcon-Röhrchen wurden 15 ml Lymphozyten-Separationsmedium (PAA Laboratories) als Dichtegradientenmedium, mit einer Dichte von $1,077 \text{ g/cm}^3$, vorgelegt. Dieses wurde dann vorsichtig mit dem Blut/Heparin/RPMI-Gemisch überschichtet. Die Zentrifugation fand ohne Bremse bei 1520 U für 30 min (Hermle Z 360 K; Eppendorf) statt. Die Zellen der Interphase (Ring) wurden vorsichtig überführt und mit RPMI 1640 Medium (PAA Laboratories GmbH) gewaschen (Röhrchen auf 50 ml aufgefüllt). Die Zentrifugation erfolgte für 10 min bei 1200 U. Die entstandenen Zellpellets wurden nochmals mit RPMI 1640 (auf 50 ml aufgefüllt) gewaschen und anschließend gezählt. Für die Ermittlung der Zellzahl, welche mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer erfolgte, wurden 380 μl Trypanblau (Sigma-Aldrich) mit 20 μl Zellsuspension gemischt. Danach wurden alle vier Quadrate ausgezählt. Die Zellzahl ergibt sich aus dem gebildeten Mittelwert multipliziert mit 2500 (Kammer) x 20 (Verdünnung).

3.2.1 Positive Selektion von CD25⁺-Zellen mit Micro-Beads

Die gewonnenen mononucleären Zellen wurden mit kaltem sterilem MACS-Puffer gewaschen und bei 1000 U für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 90 µl Puffer pro 10⁷ Zellen resuspendiert. Dazu wurden 10 µl CD25 Micro-Beads (MACS; Miltenyi Biotec) pro 10⁷ Zellen gegeben. Alles wurde kurz geschüttelt und dann bei 6-12°C für 15 min inkubiert. Zum Waschen wurde das 10-20fache des Volumens des kalten Puffers dazugegeben und für 10 min bei 1000 U zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1 ml Puffer pro 10⁸ Zellen resuspendiert. Die Magnetsäule (LS, Miltenyi Biotec) wurde vorbereitet und mit 2 ml Puffer gespült.

Die Zellen wurden auf die Säule gegeben und es wurde mit 1 ml Puffer gewaschen. Die CD25⁺-Zellen wurden in ein sauberes Röhrchen eluiert, indem die Säule aus dem Magnetfeld genommen wurde und mit 2 ml Puffer gespült wurde (Abb. 4).

Die erhaltenen Zellen wurden für Zellkulturen, Proliferationstests oder zur FACS-Analyse verwendet.

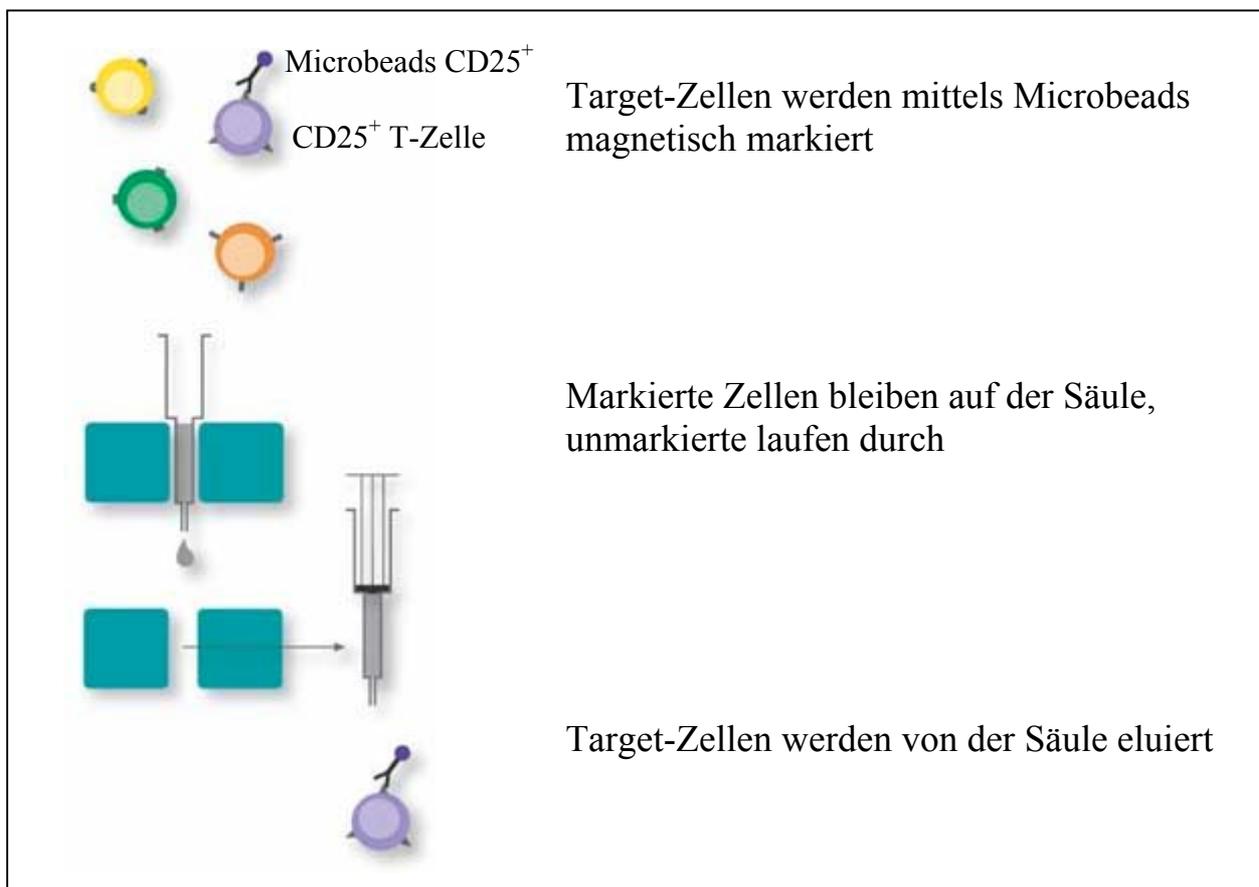


Abb. 4: Schema zur Isolierung von CD25⁺-Zellen mit der Magnetseparationsmethode

Für die *in vivo* Mausversuche wurden von gesunden Mäusen Splenozyten durch mehrmalige Spülung der Milz mit RPMI 1640 gewonnen. Zur Isolierung regulatorischer T-Zellen wurde ein CD4⁺CD25⁺ Isolations-Kit für die Maus (Miltenyi Biotec) verwendet. Der Unterschied zur humanen Isolation ist, dass die Separation in zwei Schritten erfolgte. Als erstes fand eine Depletion der unerwünschten Zellen (nicht-CD4⁺ T-Zellen) statt. Zu den isolierten gewaschenen Zellen wurde 10 µl Biotin-Antibody Cocktail pro 10⁷ Zellen gegeben, kurz geschüttelt und dann bei 4-8°C für 10 min inkubiert. Im Anschluss wurden 20 µl Anti-Biotin MicroBeads und 10 µl CD25-PE pro 10⁷ Zellen gegeben. Nach kurzem Schütteln wurden die Zellen erneut für 15 min bei 4-8°C im Dunkeln inkubiert. Zum Waschen wurde das 10-20fache des Volumens des kalten Puffers dazugegeben und für 10 min bei 1000 U zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl MACS Puffer aufgenommen und auf eine LD-Säule (im Magnetfeld) gegeben. Die unmarkierten Zellen, in diesem Fall die CD4⁺ Zellen, wurden als Durchlauf aufgefangen und für die positive Selektion verwendet. Die nicht-CD4⁺ T-Zellen blieben in der Säule hängen und wurden verworfen. Im zweiten Schritt wurden die regulatorischen T-Zellen, analog zu den humanen Zellen, durch positive Selektion gewonnen. Jedoch wurde anstelle einer LS-Säule eine MS-Säule verwendet.

MACS-Puffer: PBS; 0,5 % BSA; 2 mM EDTA

3.3 Zellkulturen

Die isolierten regulatorischen T-Zellen (CD4⁺CD25⁺) wurden in einer Zellkulturflasche (Nunc) mit einer Konzentration von 10⁶ Zellen/5 ml RPMI 1640 Medium mit Zusatz von 100 µg Refobacin und 500 µl FCS (entspricht 10 % FCS) eingesetzt. Die Konzentration der verwendeten Mitogene und des Inhibitors ist in Tabelle 4 angegeben.

Diese Zellen wurden dann für 24 Stunden in einem Inkubator (Steri-Cult200, Labotect) bei 37°C, 86 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert.

Es wurde jeweils eine Kontrolle mitgeführt, das heißt, es wurden Zellen ohne Zusatz von Mitogen und ohne Inhibitor unter ansonsten gleichen Bedingungen kultiviert. Die zur Verfügung stehenden Zellen wurden wie folgt inkubiert:

- a) Kontrolle
- b) PHA/PMA
- c) PHA/PMA+Phebestin

Tabelle 4: Eingesetzte Effektoren und Inhibitor

<i>Effektor</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Wirkung</i>	<i>Herkunft</i>
PHA	1 µg/ml	Mitogen	Roche Diagnostics
PMA	0,1 µg/ml	Mitogen	Sigma
Phebestin	10 ⁻⁶ M	Inhibitor der mAAP	Serva

3.4 Proliferationsassays

Die Proliferation der Zellen wurde über den Einbau an [³H]-markiertem Thymidin (ICN Biomedicals GmbH) gemessen. Dies ist ein Maß für die DNA-Synthese. Nach 72 Stunden Inkubation der Zellen (50.000 Zellen/well) bei 37°C mit Mitogenen und Inhibitor (Tab. 4) in der Zellkulturplatte wurde pro well 20 µl [³H]-Thymidin (Stammlösung 5 mCi 1:6 mit PBS verdünnt) zugesetzt. Die Zugabe erfolgte steril und die Zellen wurden anschließend im Brutschrank für weitere 6-8 Stunden inkubiert. Mit Hilfe des Zellerntegerätes der Firma Inotech wurden die Zellen aus der Zellkulturplatte auf einen Filter (Perkin Elmer Wallac) übertragen und luftgetrocknet. Anschließend wurde die „eingebaute“ (hochmolekulare DNA) Radioaktivität am β-Counter 1450 Microbeta TriLux (Perkin Elmer Wallac) gemessen. Als Maß für die Proliferation zählten die Zerfallsereignisse pro Minute (cpm). Die Messung erfolgte jeweils als Sechsfachbestimmung.

3.4.1 Ko-Kulturexperimente mit regulatorischen T-Zellen und depletierten MNZ

Regulatorische T-Zellen wurden wie oben beschrieben durch positive Selektion gewonnen. Die negativ selektierten Zellen wurden als CD25⁺ depletierte MNZ bezeichnet (MNZ⁽⁻⁾). Für die Ko-Kulturexperimente wurden diese beiden Zellpopulationen in unterschiedlichen Verhältnissen eingesetzt (Tab. 5).

Tabelle 5: Eingesetzte Zellen für die Ko-Kultur

<i>Verhältnis</i>		<i>Anzahl der Zellen pro Well</i>	
<i>MNZ⁽⁻⁾</i>	<i>CD25⁺</i>	<i>MNZ⁽⁻⁾</i>	<i>CD25⁺</i>
1	0	50000	0
1	1	25000	25000
4	1	40000	10000
5	1	41666	8333
8	1	44444	5555
10	1	45454	4545
18	1	47368	2632

3.5 RNA-Isolation

3.5.1 Isolierung von RNA aus Blutzellen

Nachdem die Zellen geerntet, zentrifugiert (10 min 1000 U) und der Überstand abgenommen wurde, erfolgte die Lyse der Zellen mit RLT-Puffer (Qiagen). Zur Gewinnung der RNA wurde der RNeasy-Mini-Kit der Firma Qiagen nach Angabe des Herstellers verwendet. Die isolierte RNA wurde durch DNase-Behandlung (RQ1 RNase-free DNase; 1 U/ μ l; Promega; 30 min bei 37°C) von eventuell enthaltener DNA befreit. Danach wurde die RNA nochmals einer Reinigung mit Hilfe der RNeasy-Säule unterzogen. Die DNA-freie RNA wurde spektrophotometrisch am GeneQuant (Pharmacia) quantifiziert.

Der Quotient aus der OD₂₆₀ und OD₂₈₀ lag bei allen RNA-Präparationen zwischen 1,8 und 2,0. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.5.2 Isolierung von RNA aus Darmgewebe

Bis zur Isolierung der RNA aus dem Dickdarm wurden die entnommenen Darmstücke in flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Zuerst wurde die Gewebeprobe in ein Eppendorf-Tube überführt und mit 0,5 ml TRIZOL (GIBCO/Invitrogen) versetzt und sofort wieder in den flüssigen Stickstoff gegeben. Während des Auftauens wurde das Gewebe mit einem Pistell homogenisiert. Nach der vollständigen Homogenisation wurde 0,2 ml Chloroform zugesetzt und für ca. 30 Sekunden gevortext. Anschließend fand die Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 4000 U statt. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt und mit 400 μ l 40 %igem Isopropanal versetzt. Nach kurzem Vortexen wurde das Gemisch bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Der folgende Zentrifugationsschritt fand ebenfalls bei 4°C für 15 Minuten bei 4000 U statt. Das entstandene Pellet wurde in 100 μ l RNase-freiem Wasser gelöst. Die folgenden Schritte wurden, nach Angaben des Herstellers, mit dem Total RNA Isolation Kit NucleoSpin[®] RNA II (Macherey-Nagel) durchgeführt.

3.5.3 Isolierung von RNA aus Splenozyten

Die Splenozyten wurden durch mehrmalige Spülung der Milz mit RPMI 1640 gewonnen. Zur Gewinnung der RNA aus Splenozyten wurde der Total RNA Isolation Kit NucleoSpin[®] RNA II der Firma Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.6 Reverse Transkription

Für die nachfolgende enzymatische Amplifikation (RT-PCR) wurden 1 µg DNA-freie RNA mit Hilfe von RevertAid Reverser Transkriptase und random-hexameren Oligonukleotiden in Erststang-cDNA umgeschrieben.

Ein typischer Reaktionsansatz (30 µl) bestand aus folgenden Komponenten:

1 µg RNA	
6 µl 5x Reaction Buffer	(Fermentas)
1,5 µl RevertAid M-MuLV Transkriptase	(200 U/µl, Fermentas)
0,75 µl RNase Inhibitor	(40 U/µl, Fermentas)
1,2 µl dNTP	(1 mM, InViTek)
0,6 µl random-Primer	(500 ng/µl, Roche)
Aqua deion. ad 30 µl	

Die Proben wurden in einem Thermocycler (Eigenbau der Universität Hannover) bei 25°C für 10 Minuten inkubiert. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 42°C folgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 72°C. Bis zur Durchführung der PCR wurde die Erststrang-cDNA bei -20°C gelagert.

3.7 Quantitative RT-PCR

Zur Durchführung der quantitativen RT-PCR wurde der i-Cycler (Bio-Rad Laboratories) verwendet. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde für den Expressionsnachweis von Genen auf mRNA-Ebene eingesetzt. Die Realtime-PCR-Systeme detektieren Fluoreszenzsignale, deren Intensität mit der PCR-Produktbildung korrelieren. Als fluoreszierendes Molekül (Fluorophore) wurde das interkalierende doppelstrang-spezifische SYBRGreen I (Molecular Probes) eingesetzt, welches an Doppelstrang-DNA bindet und dadurch zum Anstieg der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Produktbildung führt.

Die PCR-Ergebnisse werden in einem Diagramm dargestellt, in dem die Anzahl der PCR-Zyklen (Cycle) gegen die Fluoreszenzintensität (RFU) aufgetragen wird. Der Zyklus, in dem die zu untersuchende Probe einen berechneten Fluoreszenzschwellenwert signifikant überschreitet, wird als Schwellenwertzyklus (Threshold Cycle) der jeweiligen Probe bezeichnet. Je niedriger die Ct-Werte sind desto stärker ist demnach das PCR-Signal.

Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Anregung eingesetzter Fluorophore durch kurzwelligeres Licht, als Folge wird langwelligeres Licht emittiert. Die Emission wurde von optischen Detektionseinheiten nach jedem PCR-Zyklus gelesen und die Fluoreszenzintensität ausgewertet.

Ein typischer Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten (25 µl Ansatz):

12,5 µl TaqTM PCR MasterMix (Qiagen)

0,25 µl SYBRGreen I 10x concentrate (Molecular Probes)

0,25 µl Fluorescein Calibration Dye 1 µM (Bio-Rad)

2,5 µl Primerpaar (5 µM) (siehe Tab. 6)

1 µl cDNA (entspricht 1 µg cDNA)

Aqua deion. ad 25 µl

Der Ablauf einer PCR ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 6: Für die quantitative RT-PCR verwendete Primer

<i>Gen</i>	<i>Länge des Amplifikates</i>	<i>Annealing Temperatur</i>	<i>Sequenz 5' →</i>	<i>Herkunft</i>
TGF-β ₁ Human	187 bp	60°C	Sense: CAGAAATACAGCAACAATTCCTGG Antisense: TTGCAGTGTGTTATCCGTGCTGTC	BioTeZ GmbH
TGF-β ₁ Maus	197 bp	59°C	Sense: CGCTTGCAGAGATTA AAA Antisense: TGAATCGAAAGCCCTGTA	Jena Bioscience GmbH
FoxP3 Maus	183 bp	59°C	Sense: CCTGGATGAGAAAGGCAAG Antisense: GGCTACGATGCAGCAAGAG	BioTeZ GmbH
FOXP3 Human	359 bp	62°C	Sense: TGTCAGTCCACTTCACCAAG Antisense: AGCTGGTGCATGAAATGTGG	BioTeZ GmbH
T-bet Maus/ Human	346 bp	63°C	Sense: AACCACCTGTTGTGGTCCAAG Antisense: TCATCTGGGTCACATTGTTGG	BioTeZ GmbH
P0 Maus	344 bp	60°C	Sense: GCACTTTCGCTTTCTGGAGGGTGT Antisense: TGA CT TGGTTGCTTTGGCGGGATT	BioTeZ GmbH

α -Tubulin Maus/ Human	527 bp	60°C	Sense: CACCCGTCTTCAGGGCTTCTTGGTTT Antisense: CATTTCACCATCTGGTTGGCTGGCTC	BioTeZ GmbH
IL-2 Human	457 bp	62°C	Sense: ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTT Antisense: GTCAGTGTTGAGATGATGCTTTGAC	BioTeZ GmbH
IL-10 Human	204 bp	60°C	Sense: GCCTAACATGCTTCGAGATC Antisense : TGATGTCTGGGTCTTGGTTC	BioTeZ GmbH
IL-10 Maus	420 bp	60°C	Sense : CTGCTATGTTGCCTGCTCTT Antisense : ATCATTCTTCACCTGCTCCAC	BioTeZ GmbH

In der Reaktion wurde parallel zur eigentlichen Probe ein definierter Standard eingesetzt. Der Bezug zu dem Standard erlaubt eine verlässliche Aussage über die Anzahl spezifischer mRNA-Moleküle. Als Standard diente ein in Plasmide kloniertes PCR-Fragment in seriellen Verdünnungen bekannter Konzentrationen. Des weiteren wurde bei jeder Reaktion die mRNA-Menge des „housekeeping-Gen“ α -Tubulin (humane Proben) mitbestimmt. Diese dienen als Referenz-RNA-Moleküle, zur Normalisierung der RNA-Gehalte der individuellen Proben. Zur Korrektur geringer Abweichungen der α -Tubulin-Werte, wurde aus dem Fluoreszenzsignal des jeweiligen Zytokines und von α -Tubulin der Quotient gebildet. Dieser Wert wurde als Maß für die Genexpression des jeweiligen Gens herangezogen. Die Werte für die Genexpression der Maus-Experimente erhielt man durch Korrektur mit dem ribosomalen Phosphoprotein P0.

Tabelle 7: Schritte des RT-PCR-Programms

1. 2 min /95°C	Aktivierung der Taq -Polymerase
2. 30 sek /94°C	Denaturierung
3. 45 sek /siehe Tabelle 6	„Annealing“
4. 1 min /72°C	Elongation
5. 5 min /72°C	finale Elongation
6. t = ~ / 4°C	Kühlung des PCR-Produktes
(Schritt 2-4: 40 Zyklen)	

Das entstandene PCR Produkt wurde mit 3 μl „loading dye“ (Promega) gemischt und von dem Gemisch wurden 10 μl auf ein 1,8 %igem Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und am Video-Image-System (MWG-Biotech) dargestellt. Nur Proben, die ein einziges PCR-Produkt der spezifischen Größe zeigten, wurden für die Auswertung verwendet.

3.8 Bestimmung des TGF- β_1 -Gehaltes in den Überständen der Zellkulturen

Zur Bestimmung von TGF- β_1 in humanen Kulturüberständen wurde ein nicht-kommerzieller ELISA verwendet [Reinhold].

Das Prinzip dieses Sandwich-ELISA beruht auf einer spezifischen Antigen-Antikörperreaktion, in Kombination mit Enzym-gekoppeltem sekundären Antikörper und nachfolgender Umsetzung (Farbumschlag) chromogener Substrate. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden mit einem primären Antikörper beschichtet. Nach Zugabe der Proben binden darin enthaltene Antigene an diesen Antikörper. Ungebundene Proteine werden ausgewaschen, und die Platte wird mit einem zweiten bzw. dritten, enzymmarkierten Antikörper beschichtet. Nach einem erneuten Waschschrift wird ein Substrat zugegeben welches das Enzym umsetzt und zu einem Farbumschlag führt. Durch Zusatz einer Stopplösung wird nach einer definierten Zeit der Umsatz unterbrochen und der Test photometrisch ausgewertet. Nachfolgend sind die einzelnen Schritte und die eingesetzten Reagenzien beschrieben. In hochaffine ELISA-Platten (Greiner) wurde neutralisierender monoklonaler Maus-anti-TGF- β_1 -Antikörper (Genzyme; 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gegeben (100 $\mu\text{l}/\text{well}$) und bei 37°C über Nacht inkubiert. Danach wurde der ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ PBS-Tween entfernt und die freien Bindungsstellen mit Blocking-Puffer (200 $\mu\text{l}/\text{well}$) abgesättigt. Ein weiterer Waschzyklus schloss sich an und die vorbereiteten Proben (100 $\mu\text{l}/\text{well}$) sowie der TGF- β_1 -Standard (BDP 1) (25 ng/ml) wurden zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C und dreimaligem Waschen wurde der monoklonale Huhn-Anti-TGF- β_1 Antikörper (Klon BDA 19, R&D System; 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$; 100 $\mu\text{l}/\text{well}$) für eine Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Ein weiterer Waschzyklus folgte. Als letzter Antikörper wurde ein biotinylierter-Kaninchen-anti-Huhn polyklonaler-Antikörper (IgG), (Dianova; 100 $\mu\text{l}/\text{well}$) ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur in die Wells gegeben. Nach dreimaligem Waschen wurde alkalisches Streptavidin-Phosphatase-Konjugat zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dann wurde das überschüssige Enzym ausgewaschen (dreimal mit PBS-Tween) und erneut nach Zugabe einer Substratlösung (Sigma FastTM p-Nitrophenylphosphat-Tabletten-Set; SIGMA;

100 µl/well), ebenfalls im Dunkeln, für 30 Minuten inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion mit Stopplösung (50 µl/well) unterbrochen. Der dabei im Verhältnis zur Menge des gebundenen TGF-β₁ entstandene Farbumschlag wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Durch den Vergleich mit der Standard-Kalibrationskurve wurde der TGF-β₁ Gehalt in den einzelnen Proben bestimmt.

Mit einem Teil der Proben wurde vorher eine Aktivierung durchgeführt. Dazu wurde die Probe in silanisierte Eppendorf-Röhrchen gegeben und mit 2,5 M HCl versetzt (5 µl /100 µl Probe). Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Probe mit Hilfe von 5 µl 2,5 M NaOH neutralisiert.

Waschpuffer (PBS-Tween):	0,1 % Tween 20 (Merck) in PBS, pH 7,4
Blocking-Puffer:	150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH=7,5), 1 % RSA
TGF-β ₁ -Standard (1 µg/100 µl)	gelöst in 100 µl 0,01 % Triton-X (0,5 ml 0,2 % Triton+9,5 ml Aqua deion.) für den Test 1µl + 400 µl Waschpuffer (entspricht 25 ng/ml)
Sigma Fast™ p-Nitrophenylphosphate Tabletten:	pNPP-Tablette und Tris-Puffer-Tablette in 20 ml Aqua deion. lösen
Stopplösung:	2 N NaOH

3.9 Durchflusszytofluorometrie

Die Durchflusszytofluorometrie ist eine sehr effiziente Methode, um die Expression von Oberflächenantigenen auf Zellpopulationen zu untersuchen.

Die Zellen werden dabei mit einem Antikörper inkubiert, welcher spezifisch gegen ein bestimmtes Oberflächenmolekül gerichtet ist. Eine fluoreszierende Komponente ist entweder direkt an den ersten Antikörper gekoppelt oder ein direkt markierter Zweitantikörper wird an den Erstantikörper gekoppelt. Der hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff war TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat), welcher Licht bei 585 nm („rot“) emittiert. Als Negativkontrolle diente ein Antikörper gleichen Isotyps mit einer Spezifität, die nicht auf diesen Zellen vertreten ist (Tab. 8). Jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml wurden für einen Ansatz eingesetzt.

Tabelle 8: Für die FACS-Analyse verwendete Antikörper

<i>Spezifität</i>	<i>eingesetzte Menge</i>	<i>Gekoppelt</i>	<i>Spezies</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Konzentration</i>
anti-human-TGF- β_1 (primär)	5 μ l		chicken	IgY	R&D Systems	1 mg/ml
Anti-Chicken-IgY (sekundär)	1 μ l	TRITC	rabbit	IgG	Sigma Chemical	5,1 mg/ml
IgG ₁ (Isotypenkontrolle)	10 μ l		mouse	IgG1	Diatec	0,2 mg/ml

Nach 20 Minuten Inkubation der Zellen mit dem Antikörper bei 4°C wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte durch Zugabe von 1 % Paraformaldehyd (ICN) für 5 min und anschließend wurde die Oberflächenfluoreszenz am FACS-Calibur (Becton Dickinson) bestimmt.

3.10 Lyse der Zellen (für Westernblot)

Jeweils 3×10^6 regulatorische T-Zellen wurden geerntet und einmal mit 1xPBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 50 μ l Lysepuffer versetzt und mehrmals gevortext. Nach 30 min auf Eis erfolgte die Zentrifugation (13000 U/min) für 30 min bei 4°C. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Lysegrundpuffer:

50 mM Tris-HCL

5 mM EDTA

0,5 % Triton

10 % Glycerol

10 mM K₂HPO₄

0,5 % NP-40

Inhibitorcocktail (25x konzentriert):

1 Tablette complete™, Mini EDTA-free (Protease inhibitor cocktail tablets) (Boehringer-Mannheim) in 2 ml Aqua deion.

Lysepuffer:

1,43 ml Lysegrundpuffer

100 µl 10 % DOC

80 µl Inhibitorcocktail (25x konzentriert)

40 µl 1 M NaF

8,92 mg Na₄P₂P₇ 10 H₂O

2 µl 0,1 M PMSF

0,4 ml 0,1 M Glycerol-2-Phosphat

3.11 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen kam der „BCA Protein Assay Kit“ (Pierce, Weiskirchen) nach Anweisung des Herstellers zur Anwendung. Die Proben wurden 1:2 bzw. 1:5 mit Aqua deion. verdünnt und nach Zugabe von 200 µl der BCA-Lösung für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Quantifizierung des Proteingehaltes erfolgte anhand einer BSA-Standardgerade durch Messung der Extinktion bei 590 nm in einem automatisiertem Plattenreader (anthos Reader 3; anthos Mikrosysteme GmbH).

3.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Für die Herstellung der Polyacrylamidgele wurden die Glasplatten mit den Abstandhaltern in die Halterung eingespannt und im Gießstand (BioRad) fixiert. Die Lösungen für Trenn- und Sammelgel wurden unter Verwendung gebrauchsfertiger Acrylamidlösungen der Firma Roth hergestellt.

Sammelgel: 12 %

0,7 ml Acrylamid (30 %)

1,26 ml 0.5 M Tris/Cl, pH 6,8

3 ml Aqua deion.

50 µl 10 % SDS

20 µl TEMED
50 µl 10 % APS

Trenngel: 12 %

7,7 ml Acrylamid (30 %)
4,7 ml 0.5 M Tris/Cl, pH 8,8
6,1 ml Aqua deion.
187 µl 10 % SDS
187 µl TEMED
20 µl 10 % APS

Das verwendete Acrylamid/Bisacrylamid lag in einem Verhältnis von 37,5:1 vor. Die Proben wurden entsprechend der Proteinmenge mit Laemmli-Probenpuffer (Sigma) versetzt. Bei Verwendung des TGF- β Antikörpers wurden die Proben teilweise reduziert, indem sie mit reduzierendem Probenpuffer (mit 2-Mercaptoethanol) für 5 Minuten zum Denaturieren der Proteine bei 96°C aufgekocht wurden. Insgesamt betrug das aufgetragene Volumen 50 µl je Well. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Gelkammer der Firma BioRad unter Verwendung des Rotiphorese 10xSDS-Page-Laufpuffers (1:10 verdünnt, Roth) bei 120-150 mA für ca. 1,5 Stunden bis zum Austreten der Lauffront des Bromphenolfarbstoffes. Zur Bestimmung der Größe der Proteine wurde ein Protein-Standard (Serva Prestained SDS PAGE Protein Marker 6,5-200 kDa oder peqGOLD Protein Marker IV 11-170 kDa der Firma peqlab) mitaufgetragen.

3.13 Western Blot-Analyse

3.13.1 Proteintransfer

Proteine können durch elektrophoretischen Transfer aus SDS-Polyacrylamidgelen auf geeignete Membranen überführt werden. Die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden mittels semi-dry-Blot (Transblot SD, Biorad) auf eine Nitrocellulosemembran (BA 83, 0,2 µm, Schleicher+Schuell) transferiert. Membran und Filterpapier (Schleicher+Schuell, Roth) wurden in Blot-Puffer (Natriumborat, pH 9,2; 10 % Methanol) getränkt und dienen als Pufferreservoir. Es wurde ein Sandwich aus zwei dicken Filtern, drei dünnen Filtern, der Nitrocellulosemembran, dem Gel, drei dünnen Filtern und weiteren zwei dicken Filtern auf

der Anodenplatte aufgeschichtet. Entstandene Luftblasen wurden vorsichtig entfernt. Der Transfer erfolgte bei RT, 25 V und 100 mA pro Blot für 1 Stunde.

3.13.2 Proteinnachweis mit Antikörpern

Nach dem Transfer der Proteine auf die NC-Membran wurde ÜN bei 4°C diese in 5 %igem Block-Puffer gelagert um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren und eine evtl. unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern.

Wasch-Puffer (1xPBST):

1xPBS

0,1 % TWEEN 20

Block-Puffer:

1xPBST

5 % Magermilchpulver (Roth)

AP-Puffer:

Tris pH 9,5 38 mM

MgCl₂ 5,4 mM

NaCl 50 mM

BCIP/NBT-Färbelösung:

NBT-Stammlösung 33 µl

BCIP-Stammlösung 66 µl

AP-Puffer 10 ml

NBT-Stammlösung:

75 mg/ml Nitro Blue Tetrazolium in 70 % Dimethylformamid/ 30 % H₂O₂

BCIP-Stammlösung:

50 mg/ml Bromo-chloro-indolyl-phosphattoluidinsalz in Dimethylformamid

Primäre Antikörper

chicken anti-TGF-β ₁	2 µg/ml	R&D Systems
---------------------------------	---------	-------------

anti-FOXP3 (ab10563)	1 µg/ml	abcam
----------------------	---------	-------

Sekundäre Antikörper

rabbit anti-chicken AP-konjugiert	1:2000	Sigma
Anti-rabbit IgG (HRP linked)	0,05 µg/ml	Cell Signaling

Der primäre Antikörper gegen TGF- β wurde in 1xPBS verdünnt und die NC-Membran 2 Stunden auf einem Schüttler (Duomax 1030, Heidolph) bei RT mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1xPBST (je 10 min) wurde die NC-Membran mit dem sekundären Antikörper (rabbit anti-chicken AP-konjugiert) 1 Stunde bei RT geschüttelt. Nach erneuten Waschschritten in 1xPBST (6x10 min) wurde die Membran einmal mit alkalischen Phosphatase-Puffer (siehe AP-Puffer) gewaschen.

Der Blot wurde nun in einer Detektionslösung unter stetiger Bewegung inkubiert bis die Banden erschienen und durch Zugabe von aqua deion. wurde die Reaktion beendet. Der gebundene Antikörper wurde über die Farbreaktion mit NBT/BCIP (Promega) als Substrat für die alkalische Phosphatase nachgewiesen. Nach Trocknung an der Luft konnte der Blot anschließend längere Zeit gelagert werden.

Bei Verwendung des primären FOXP3-Antikörpers erfolgte die Inkubation der NC-Membran ebenfalls für 2 Stunden. Nach drei Waschschritten mit 1xPBST (je 10 min) wurde die NC-Membran mit dem sekundären Antikörper (Anti-rabbit) 1 Stunde bei RT inkubiert.

Zur Detektion der Banden wurde die Membran in SuperSignal West Dura (Extended Duration Substrat, Pierce) getränkt und in eine Filmkassette geklebt. Die SuperSignal West Dura-Lösung setzte sich aus gleichen Teilen Luminol/Enhancer und Peroxid-Puffer zusammen. Das Chemolumineszenz-Signal konnte durch Auflegen eines Films sichtbar gemacht werden. Die Exposition der Filme (Hyperfilm, Amersham) erfolgte in einer Dunkelkammer unter Verwendung von Standard-Filmkassetten nach unterschiedlichen Zeitpunkten.

Die quantitative Auswertung der Bandenintensität erfolgte mit dem Gene Profiler Version 3.56.

3.14 Versuchstiere

Es wurden 9-12 Wochen alte weibliche Balb/c Mäuse (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland) eingesetzt. Sie wurden unter Standardbedingungen (25°C, im Zyklus: 12 Stunden Hell-Dunkel Rhythmus, 6 Mäuse auf 80 cm² Fläche) gehalten. Das Experiment

begann erst nach einer Woche Haltung unter diesen Bedingungen. Als Futter erhielten die Mäuse ein Standardpellet *ad libitum*.

3.15 Induktion einer experimentellen akuten Colitis mit Dextransulfat (DSS)

Zur Induktion einer akuten Colitis wurde weiblichen BALB/c Mäusen (Körpergewicht ca. 20 g) 3 % Dextransulfat (DSS, MG 36000-50000; ICN Biomedicals, Ohio) im Trinkwasser über sieben Tage gegeben. Diese Konzentration hat sich für die Induktion einer schweren Colitis als ausreichend erwiesen.

3.16 Entnahme und Präparation der Organe

Die Tiere wurden durch eine Überdosis an CO₂ getötet. Bei der Sektion wurde das Abdomen median eröffnet und Milz, und Darm einschließlich Rektum entnommen. Anhängendes Fett wurde von den Milzen entfernt. Anschließend wurden die Milzen bis zur Weiterverarbeitung in RPMI1640 Medium auf Eis aufbewahrt. Colon einschließlich Rektum wurden gesondert entnommen und durch leichte Spülung mit PBS manuell entleert. Colon und Cecum wurden anschließend vermessen. Das Colon wurde gedrittelt und jeweils die Hälfte vom Drittel wurde in flüssigen Stickstoff für die RNA-Präparation gelagert und die andere Hälfte wurde in 10 % gepuffertem Formalin für die Anfertigung von histologischen Schnitten aufbewahrt. Die Darmstücke wurden dann durch unterschiedliche Ethanol-Konzentrationen entwässert und in Paraffin eingebettet. Von den paraffinierten Darmstücken wurden 4-5 µm dicke Längsschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und histologisch beurteilt („verblindet“). Ein erfahrener Pathologe erstellte den histologischen Score der Tiere. Zur histologischen Beurteilung wurde ein Score aufgestellt (Tab. 9), da in der Literatur kein geeigneter histologischer Score auffindbar war.

Tabelle 9: histologischer Score

<i>Befund</i>	<i>Score</i>
Verlust der Krypten-Architektur	
Nein	0
Fokal	1
Extensiv	2
PMN-Infiltrate (Polymorphkernige Granulozyten)	
Nein	0
Fokal	1
große Anzahl an PMN	2
Granulomartige Entzündung	
Nein	0
Fokal	1
Flächenhaft	2
Epitheliale Erosionen	
Nein	0
Fokal	1
Flächenhaft	2

Der histologische Gesamtscore setzt sich aus der Summe der einzelnen Befunde von je drei Schnitten pro Tier zusammen. Somit ergibt sich ein maximaler Gesamtscore von 8 Punkten.

3.16.1 Blutentnahme

Des weiteren wurde Blut durch Herzpunktion postmortem entnommen. Dazu wurde eine Injektionsnadel mit aufgesetzter Spritze, bei eröffneten Brustkorb, ins Herz eingeführt. Das Blut wurde mit der Spritze langsam abgezogen und zur Gerinnungshemmung mit Heparin gemischt.

3.16.2 Plasmagewinnung und Konzentrationsbestimmung

Das gewonnene Blut wurde für 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Die Überstände wurden in sterile 0,5 ml Reaktionsgefäße abpipettiert und bis zur Bestimmung der TGF- β_1 Konzentration bei -80°C eingefroren. Zur Bestimmung des TGF- β Gehaltes im Plasma der Mausproben wurde der kommerziell erhältliche Quantikine mouse/rat/porcine TGF- β_1 Immunoassay (R&D Systems) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Farbumschlag wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm am Plattenreader (anthos Reader 3) gemessen. Die Referenzwellenlänge betrug 570 nm.

3.17 Scoring

Die Beurteilung des Gesundheitszustandes der Tiere erfolgte in regelmäßigen Abständen durch Erhebung eines klinischen Colitis-Scores. Der Körpergewichtsverlust, die Stuhlkonsistenz und die Rektal-Blutung umfassten die Parameter für den Gesamtscore (Tab. 10).

Tabelle 10: Parameter des klinischen Colitis-Score (disease activity index)

<i>Score</i>	<i>Körpergewichtsverlust</i>	<i>Stuhlkonsistenz</i>	<i>Rektal-Blutung</i>
0	< 5 %	normal geformt	keine
1	5-10 %		
2	10-15 %	pastös, halbgeformter Stuhl	Haemoccult positiv
3	15-20 %		
4	>20 %	flüssiger Stuhl	deutlich sichtbare Blutung

3.17.1 Gewichtsveränderung

Es wurde bei den Tieren täglich das Körpergewicht bestimmt und die auftretenden Gewichtsveränderungen in Prozent zum anfänglichen Gewicht ausgedrückt. Die Gewichtsveränderungen an aufeinander folgenden Tagen in gesunden Tieren variieren bis zu 4 %. Deshalb wurden für bis zu 5 % Gewichtsverlust noch keine Scorepunkte vergeben.

3.17.2 Stuhlkonsistenz und Rektal-Blutung

Es wurde täglich von jedem Tier eine Stuhlprobe entnommen und optisch die Konsistenz bestimmt. Des Weiteren wurde ein Haemoccult-Test (Hemoccult sensa; Beckmann-Coulter) durchgeführt, welcher zur Detektion von okkultem Blut verwendet wurde.

3.18 Dickdarmlänge

Die Tiere wurden, je nach Versuchsgruppe, am Tag 4, Tag 5 oder Tag 7 durch CO₂ Überdosis getötet, der Dickdarm herauspräpariert und von Stuhlpellets befreit. Danach wurde die Länge des Dickdarms und des Cecum gemessen. Je länger der Dickdarm ist, desto weniger liegt eine entzündungsbedingte Verkürzung bzw. Ödembildung vor, d.h. je länger der Darm, desto weniger entzündet ist er.

3.19 Durchführung der Tierversuche

Für die erste Versuchsreihe wurden aus gesunden Mäusen die Splenozyten isoliert und wie in Absatz 3.2.1 beschrieben mittels Micro-Beads die regulatorischen T-Zellen gewonnen. Am dritten Tag nach Beginn der DSS-Gabe begann die Behandlung (Tab. 11). Zur Injektion der Zellen bzw. des Inhibitors in die Schwanzvene der Mäuse, wurden diese zur Ruhigstellung mit Diethyl-Ether betäubt. Dieser Versuch wurde zweimal mit je drei bzw. vier Tiere pro Gruppe durchgeführt.

Tabelle 11: Behandlungsplan der DSS-Mäuse (Versuchsreihe 1a und 1b)

<i>Gruppe</i>	<i>Behandlung</i>	<i>Dosierungsplan Tag 3</i>			<i>Gesamtmenge der Injektion (gelöst in Hanks)</i>
		<i>Konzentration von Phebestin</i>	<i>Anzahl der Zellen</i>	<i>Zeit der Prä-inkubation</i>	
1	Hanks	-	-	-	20 µl
2	Phebestin	10 µg	-	-	20 µl
3	Treg	-	1,5 Mio	-	20 µl
4	Treg+Phebestin	10 µg	1,5 Mio	45 Minuten	20 µl

Es wurden am Versuchstag 3 jeweils 20 µl Salzlösung, Zellsuspension, Inhibitor oder die Kombination aus Zellsuspension und Inhibitor intravenös in die Schwanzvene der Maus injiziert. Ein Teil der Treg wurde vorher für 45 Minuten mit Phebestin vorinkubiert (Versuchsgruppe 4). Die Tiere wurden nach der Injektion für einige Stunden beobachtet.

Das Scoring erfolgte weiterhin, bis zum Tag 7. Die Tiere wurden mit einer CO₂ Überdosis getötet (Abb. 6).

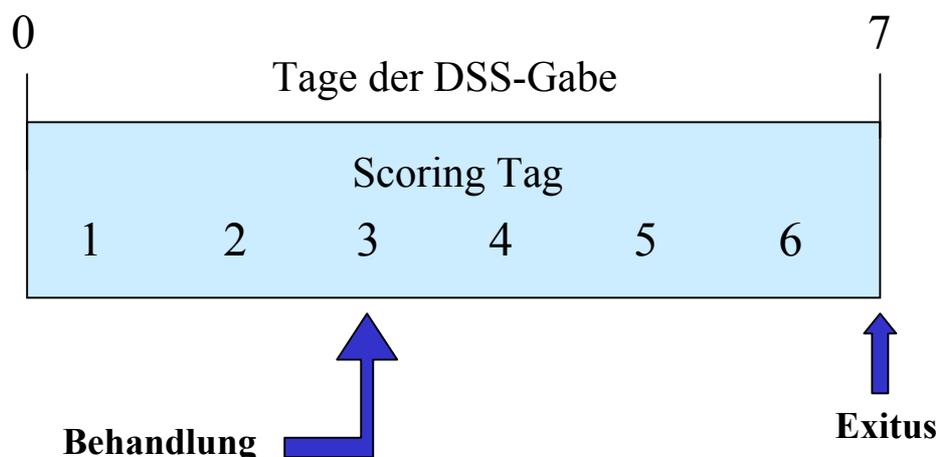


Abb. 6: Versuchsablauf der Versuchsreihe 1a, einmalige Injektion des Inhibitors, Exitus am Tag 7

Eine weitere Versuchsreihe war identisch der ersten, jedoch wurde ein Teil der Tiere bereits am 4. Versuchstag getötet. Der andere Teil der Tiere wurde am Tag 5 getötet (Abb. 7). Dieser Versuch wurde mit 10 Tieren pro Gruppe durchgeführt, wobei fünf Tiere am Tag 4 und fünf Tiere am Tag 5 getötet wurden.

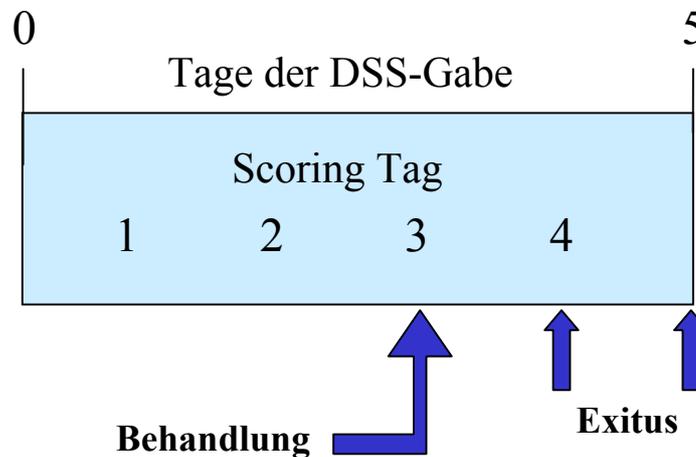


Abb. 7: Versuchsablauf der Versuchsreihe 1b, einmalige Injektion des Inhibitors, Exitus am Tag 4 oder 5

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Gesamtdosis an Phebestin erhöht. Die Injektion erfolgte ab dem zweiten Tag, entweder einmal täglich mit je 50 µg (Gesamtdosis 250 µg) oder zweimal täglich mit je 50 µg (Gesamtdosis 500 µg). Die Kontrollgruppe erhielt ab dem zweiten Tag zweimal pro Tag PBS (Tab. 12).

Tabelle 12: Behandlungsplan der DSS-Mäuse (Versuchsreihe 2)

Gruppe	Behandlung	Applikations-/Dosierungsplan					Gesamtdosis pro Tier
		Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	
1	PBS	2x	2x	2x	2x	2x	
2	Phebestin	1x50 µg	1x50 µg	1x50 µg	1x50 µg	1x50 µg	250 µg
3	Phebestin	2x50 µg	2x50 µg	2x50 µg	2x50 µg	2x50 µg	500 µg

Die Injektionen erfolgten diesmal jedoch intraperitoneal, da es nicht möglich war die Substanz über mehrere Tage in die Schwanzvene zu injizieren. Die Tiere wurden am Tag 7 mittels einer CO₂ Überdosis getötet (Abb. 8). Der Versuch wurde einmal mit 10 Tieren pro Gruppe durchgeführt.

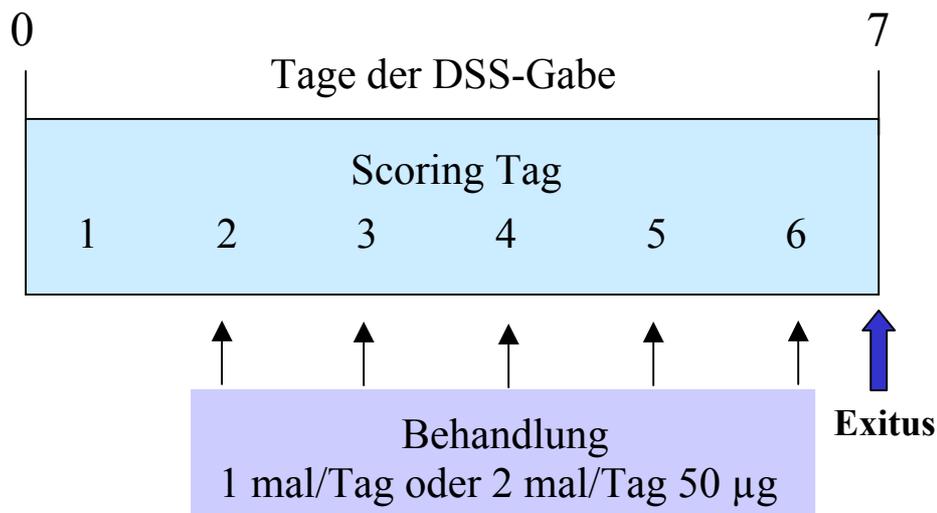


Abb. 8: Versuchsablauf der Versuchsreihe 2, mehrmalige Injektion des Inhibitors, Exitus am Tag 7

3.20 Markierung regulatorischer T-Zellen mit CellTracker Green CMFDA

Frisch isolierte regulatorische T-Zellen (2×10^6) aus gesunden Mäusen wurden zusammen mit 10 μg Phebestin (in 40 μl Hanks' Salt Solution (Biochrom AG) und 8 μl einer 10 μM CellTracker Green CMFDA (Molecular Probes) Lösung für 15 min bei 37°C inkubiert. Somit hatte die Farbstofflösung eine Konzentration von 2 μM . Anschließend wurden 140 μl Hanks zu den Zellen gegeben. Jeweils 1×10^6 markierte regulatorische T-Zellen wurden einem DSS-induziertem Tier intravenös (Schwanzvene) injiziert. Um zu überprüfen ob die regulatorischen T-Zellen den Darm erreichen, wurden 24 Stunden nach der Injektion die Tiere getötet. Der Darm wurde wie bereits unter 3.16 beschrieben entnommen und präpariert. Die entnommenen Organe wurden in 4 %igem Paraformaldehyd für 7 Tage inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation für einen weiteren Tag in 30 %iger Sucrose/PBS Lösung.

Die Därme wurden im Kryostat (Leica) bei -25°C (Kammertemperatur), -18°C (Objekttemperatur) geschnitten. Es wurden 10 μm dicke Schnitte angefertigt, mit Objektträgern aufgenommen und bei Raumtemperatur im Dunkeln luftgetrocknet. Die Betrachtung der Darmschnitte erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Axiovert TV135 Zeiss, Filterset 10, 40x Objektiv). Die Anregung erfolgte mit einer Wellenlänge von 492 nm, die Emission wurde bei 517 nm detektiert.

3.21 Statistik

Die Daten der Proliferationsbestimmung, mRNA-Gehalt-Bestimmung, FACS-Analyse und der Tierversuche wurden als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben, wobei n die Anzahl der den Mittelwerten zugrunde liegenden Versuche bezeichnet. Bei den Vergleichen zwischen drei und mehr Werten wurden die Daten durch eine Varianzanalyse (ANOVA) auf signifikante Unterschiede getestet, wobei ein p-Wert von $<0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurde.

4. Ergebnisse

4.1 Auswertung der *in vitro* Versuche mit humanen regulatorischen T-Zellen

Um den Einfluss von Inhibitoren der mAAP auf die Funktion und Wirkungsweise regulatorischer T-Zellen zu bestimmen, wurden mit humanen regulatorischen T-Zellen gesunder Probanden, *in vitro* Versuche durchgeführt. Es wurde der Einfluss des Amino-peptidase-Inhibitors Phebestin an humanen Treg auf die Proliferation, Sekretion von Zytokinen (TGF- β_1) und die Gen- (TGF- β_1 , FOXP3, T-bet, IL-10, IL-2) und Oberflächenexpression (TGF- β_1) sowie deren suppressive Aktivität bestimmt.

4.1.1 Steigerung der immunsuppressiven Aktivität humaner CD4⁺CD25⁺ T-Zellen durch den Amino-peptidase-Inhibitor Phebestin

Die durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen mononukleären Zellen (MNZ) stimuliert man mit PHA, so führt dies zu einer Induktion der Zellproliferation. PHA stimulierte MNZ⁽⁻⁾ (CD25⁺ depletierte MNZ) proliferieren dreimal mehr als normale MNZ, da ihnen die suppressiven CD4⁺CD25⁺ T-Zellen fehlen (Abb. 9A).

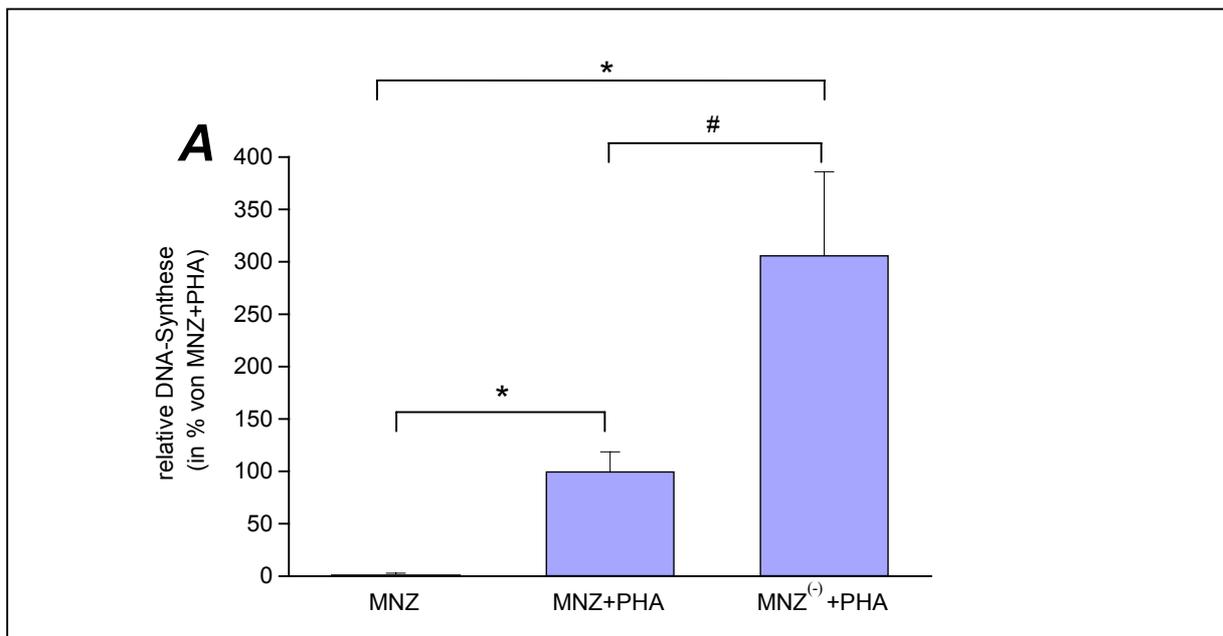


Abb. 9A: Proliferation PHA aktivierter MNZ und MNZ⁽⁻⁾. Die Zellen wurden über drei Tage bei 37°C kultiviert. Danach wurden die Zellen 6 Stunden mit [³H]-Thymidin markiert und anschließend die Menge des inkorporierten [³H]-Thymidins gemessen. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM aus 4 unabhängigen Versuchen (Sechsfachbesimmung). # $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Um nochmals deutlich zu machen, dass die $CD4^+CD25^+$ T-Zellen die Zellpopulation sind, welche zu einer Suppression der Proliferation führen, wurden beide Zellpopulationen für einen Ko-Kultur-Proliferationstest in unterschiedlichen Verhältnissen eingesetzt. Die Zugabe von $CD4^+CD25^+$ zu den $MNZ^{(-)}$ T-Zellen führt zu einer Inhibierung der PHA induzierten Proliferation, welche mit der Anzahl der zur Ko-Kultur zugesetzten $CD4^+CD25^+$ T-Zellen korreliert. Zuvor aktivierte regulatorische T-Zellen supprimieren die Proliferation von $MNZ^{(-)}$ jedoch nicht, sondern es kommt zu einer Verdopplung der Proliferation im Vergleich zu PHA stimulierte $MNZ^{(-)}$, zu denen frisch isolierte unstimulierte $CD4^+CD25^+$ T-Zellen zugesetzt wurden (Abb. 9B).

$CD4^+CD25^+$ T-Zellen, welche 30 Minuten mit Phebestin (10^{-6} M) vorinkubiert wurden, werden ebenfalls in unterschiedlichen Verhältnissen zur Ko-Kultur gegeben. Es zeigte sich durch die Zugabe von Phebestin eine signifikante Verstärkung der Suppression und damit verbunden ein Abfall der Proliferation verglichen mit PHA aktivierten Zellen des gleichen Zellverhältnisses (Abb. 9C).

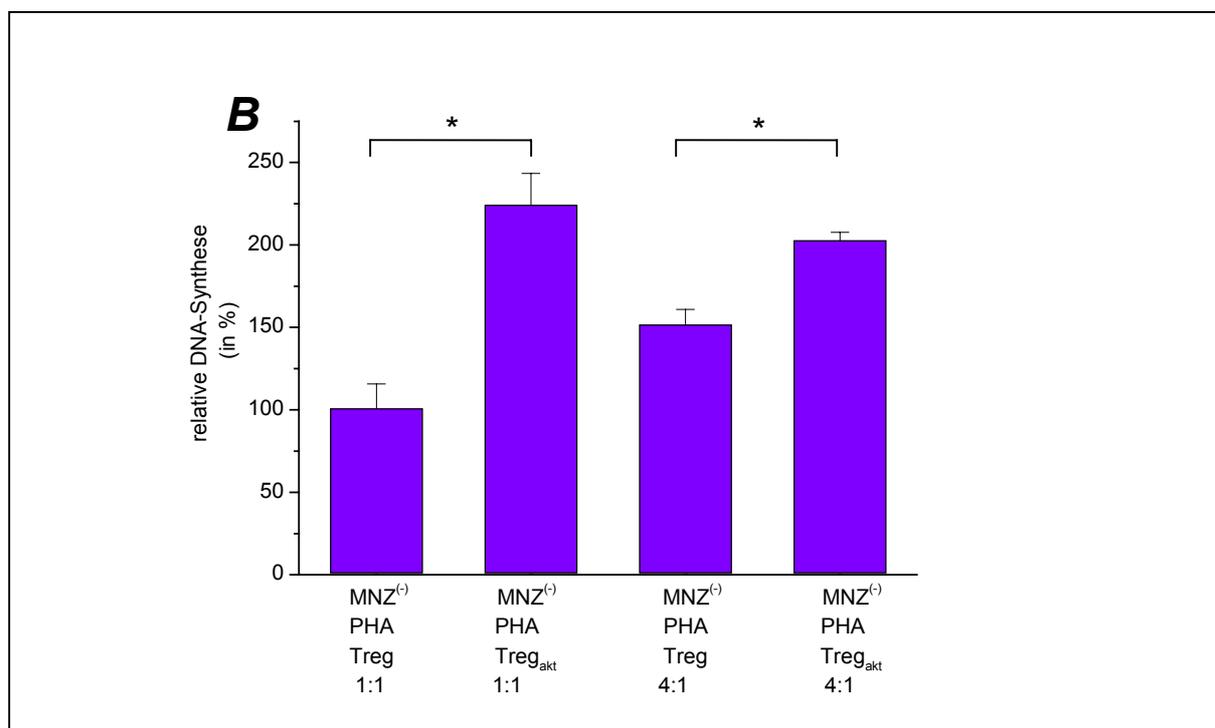


Abb. 9B: DNA-Synthese von depletierten MNZ ($MNZ^{(-)}$) und regulatorischen T-Zellen (Treg). Ko-Kultur mit $MNZ^{(-)}$ und Treg in unterschiedlichen Verhältnissen. Die Zellen wurden über drei Tage bei $37^{\circ}C$ kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen 6 Stunden mit $[^3H]$ -Thymidin markiert und anschließend die Menge des inkorporierten $[^3H]$ -Thymidins gemessen. Treg_{akt}= regulatorische T-Zellen welche mit PHA voraktiviert wurden. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM aus 4 unabhängigen Versuchen (Sechsfachbesimmung). * $p < 0,05$

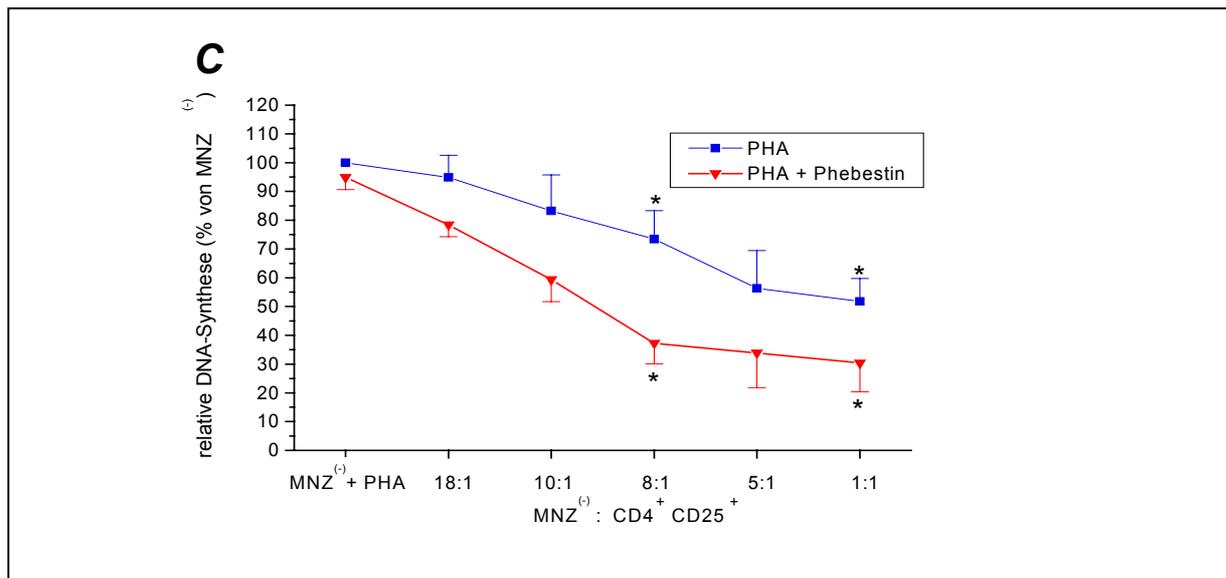


Abb. 9C: DNA-Synthese von depletierten MNZ (MNZ⁽⁻⁾) und regulatorischen T-Zellen (Treg). Ko-Kultur mit MNZ⁽⁻⁾ und Treg in unterschiedlichen Verhältnissen. Konzentration des eingesetzten Inhibitors Phebestin: 10⁻⁵ M. Die Zellen wurden über drei Tage bei 37°C kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen 6 Stunden mit [³H]-Thymidin markiert und anschließend die Menge des inkorporierten [³H]-Thymidins gemessen. Angegeben ist der Mittelwert ± SEM aus 7 unabhängigen Versuchen (jeweils Sechsfachbesimmung). * p=<0,05

4.1.2 Bestimmung des Effektes des Aminopeptidase-Inhibitors Phebestin auf die Funktion regulatorischer T-Zellen

Aminopeptidase-Inhibitoren beeinflussen sowohl die Gen- und Oberflächenexpression als auch die DNA-Synthese von regulatorischen T-Zellen. In Vorversuchen erwies sich der Aminopeptidase-Inhibitor Phebestin als sehr effektiv. Die folgenden Versuche fanden, wenn nicht anders angegeben, mit der Phebestinkonzentration von 10⁻⁶ M statt.

4.1.2.1 Genexpression

Der IL-2 mRNA-Gehalt von ruhenden regulatorischen T-Zellen lag unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methode (i-Cycler). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Zellen durch die Separation aktiviert wurden. Nach Aktivierung mit PHA/PMA erlangten die Treg die Fähigkeit IL-2 zu exprimieren. Durch Zugabe des Inhibitors Phebestin zur Zellkultur wird der IL-2 mRNA-Gehalt, im Vergleich zu den PHA/PMA stimulierten Zellen um 18 % gesenkt und damit der Aktivierungseffekt teilweise wieder aufgehoben (Tab. 13).

Ebenfalls nicht in ruhenden Treg wird IFN-γ exprimiert (Daten nicht gezeigt), welcher auch einen Aktivierungsmarker von T-Zellen darstellt.

Großes Interesse galt dem antiinflammatorischen Zytokin TGF- β_1 . Wie bereits in der Literatur beschrieben, besitzen Treg einen hohen TGF- β_1 mRNA-Gehalt [34;47;91;92]. Durch Real-Time-PCR wurde der eindeutige Nachweis erbracht, dass regulatorische T-Zellen das TGF- β_1 -Gen konstitutiv exprimieren. Der Aminopeptidase-Inhibitor Phebestin steigert die TGF- β_1 -Expression enorm. Im Vergleich mit der PHA/PMA Zellkultur, exprimieren Treg, welche mit PHA/PMA stimuliert und Phebestin der Zellkultur zugesetzt wurde, über 20 mal mehr TGF- β_1 . Unstimulierte Zellen (Kontrolle) zeigen einen höheren TGF- β_1 mRNA-Gehalt als stimulierte (PHA/PMA) Zellen. Es findet somit eine aktivierungsabhängige „down-Regulation“ der TGF- β_1 -Expression statt.

Unstimulierte regulatorische T-Zellen exprimieren mehr IL-10 als unstimulierte T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Es wurde jedoch kein Unterschied zwischen unstimulierten, stimulierten (PHA/PMA) und stimulierten Treg mit Zusatz des Inhibitors Phebestin beobachtet.

Des Weiteren galt das Interesse dem Transkriptionsfaktor FOXP3, welcher stark in CD4⁺CD25⁺ T-Zellen exprimiert wird. Depletierte MNZ bzw. T-Zellen exprimieren FOXP3 nur in sehr geringem Maße. Die FOXP3 mRNA-Expression, der mit PHA/PMA stimulierten regulatorischen T-Zellen nimmt im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Kontrolle) deutlich ab. Der Zusatz von Phebestin zur Zellkultur führt zu einer Erhöhung der Expression um 50 % im Vergleich zu den stimulierten Zellen (Abb. 10).

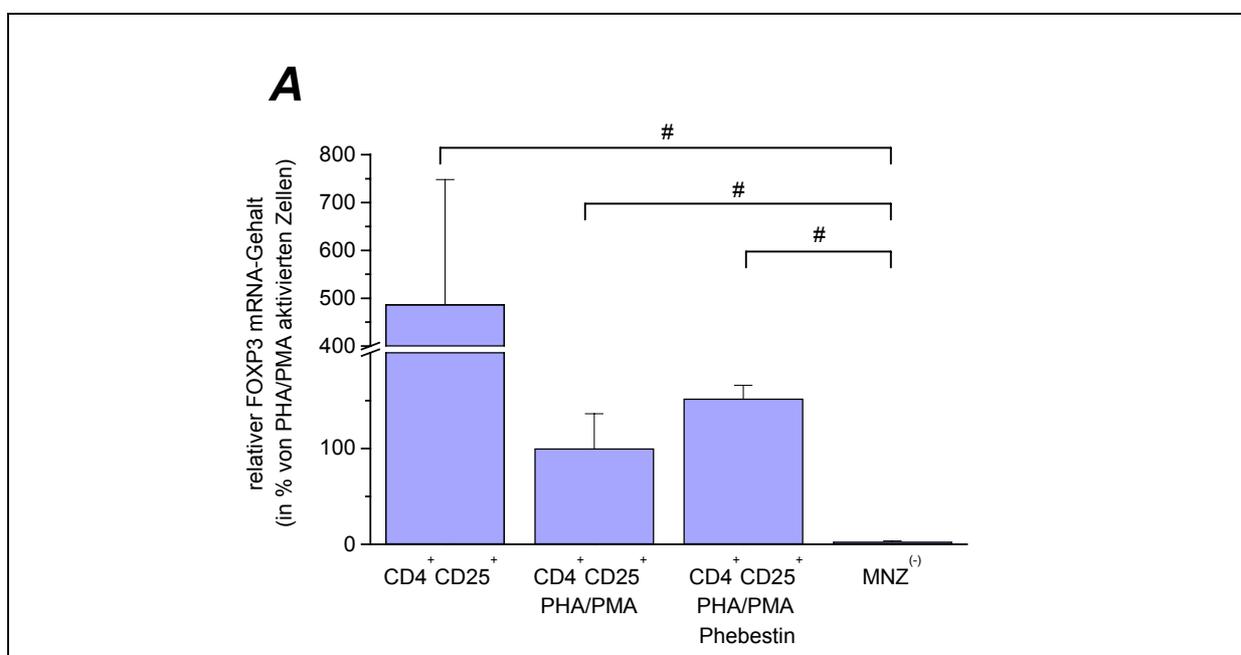


Abb. 10A: FOXP3 mRNA-Gehalt von humanen regulatorischen T-Zellen nach 24 Stunden Inkubation. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit Hilfe des i-Cyclers. Es ist der Mittelwert \pm SEM aus n=5 unabhängigen Versuchen angegeben. # p=<0,01

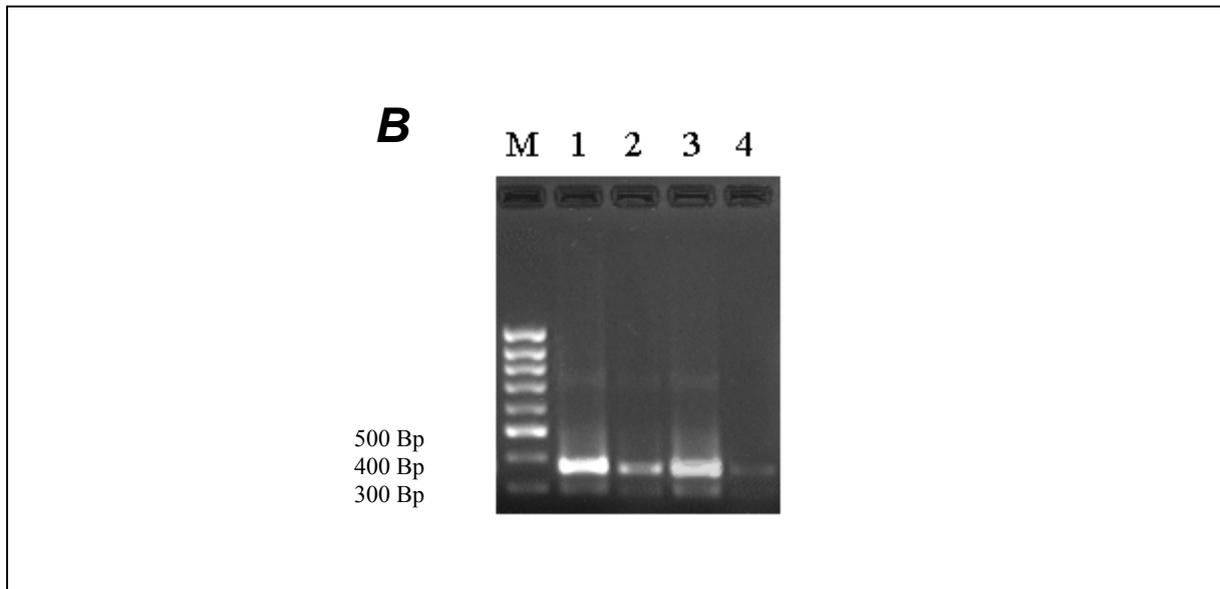


Abb. 10B: Gelelektrophorese der FOXP3 RT-PCR-Produkte (359 Bp). Es wurden 10 μ l des PCR-Produktes mit 3 μ l „loading dye“ versetzt und auf einem 1,8 %igem Agarosegel aufgetragen. Zuvor wurde das Gel im Ethidiumbromid-Bad gefärbt. Die PCR wurde mit cDNA von humanen Zellen durchgeführt. 1: CD4⁺CD25⁺ Kontrolle, 2: CD4⁺CD25⁺ PHA/PMA 3: CD4⁺CD25⁺ PHA/PMA + Phebestin 10⁻⁶ M 4: MNZ (-). In der Bahn M wurden 5,5 μ l des 100 bp Markers aufgetragen.

Der Transkriptionsfaktor T-bet (T-box expressed in T cells) wird in geringen Maßen in unstimulierten regulatorischen T-Zellen exprimiert. Erst nach Stimulation mit PHA/PMA kann T-bet in regulatorischen T-Zellen eindeutig nachgewiesen werden. Der Einsatz des Inhibitors Phebestin steigert die Expression im Vergleich zu unstimulierten Zellen signifikant (Tab. 13).

Tabelle 13: Effekte von Phebestin auf die IL-2, IL-10, TGF- β_1 , FOXP3 und T-bet Expression von human CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nach 24 Stunden

<i>Stimulation</i>	<i>IL-2 mRNA (%)</i>	<i>IL-10 mRNA (%)</i>	<i>TGF-β_1 mRNA (%)</i>	<i>FOXP3 mRNA (%)</i>	<i>T-bet mRNA (%)</i>
<i>Unstimulierte Zellen (K)</i>	0	110 \pm 40	324 \pm 32.3	487 \pm 261	8,6 \pm 2,4
<i>PHA/PMA</i>	100 \pm 73	100 \pm 71	100 \pm 26.9	100 \pm 36,2	100 \pm 25,9
<i>PHA/PMA + Phebestin</i>	82 \pm 25	114 \pm 28	2295 \pm 287	152 \pm 14	127,8 \pm 6,4
	<i>n=7</i>	<i>n=7</i>	<i>n=10</i>	<i>n=5</i>	<i>n=4</i>

4.1.2.2 TGF- β_1 -Oberflächenexpression und -Sekretion

Zusätzlich zu den Untersuchungen auf mRNA-Ebene wurden die TGF- β_1 -Oberflächenexpression und -Sekretion bestimmt (Tab. 14). Die Oberflächenexpression wurde mit Hilfe der Durchflusszytofluorometrie bestimmt. Die mittlere Fluoreszenzintensität von TGF- β_1 auf unstimulierten regulatorischen T-Zellen (Kontrolle) betrug nach 24stündiger Inkubation 99,6 (mean). Die Aktivierung mit PHA/PMA führte zu einem leichten Abfall der TGF- β_1 -Oberflächenexpression. Phebestin, bei gleichzeitiger Aktivierung zur Zellkultur gegeben, erhöht die TGF- β_1 -Oberflächenexpression um etwa 14 % (im Vergleich zur Kontrolle). Des Weiteren konnten die Oberflächenmoleküle CD45RB und CTLA-4 zu 98 % bzw. zu 99 % auf frisch isolierten, unstimulierten regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden.

Erwartungsgemäß und in Übereinstimmung mit der TGF- β_1 mRNA-Expression wurde in den Kulturüberständen der regulatorischen T-Zellen, welche 24 Stunden zuvor mit PHA/PMA und Inhibitor Phebestin behandelt wurden, eine höhere Konzentration sowohl an aktiviertem als auch an Gesamt-TGF- β_1 (aktiv und latent) nachgewiesen, im Vergleich zu den PHA/PMA stimulierten Zellen (Tab. 14).

Tabelle 14 :Effekt von Phebestin auf die TGF- β_1 -Oberflächenexpression und-Sekretion von human CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nach 24 Stunden

<i>Stimulation</i>	<i>TGF-β_1 Oberflächen- expression (mfi)</i>	<i>TGF-β_1 Sekretion (Zellkulturüberstände) (pg/ml)</i>	
		<i>aktiv+latent</i>	<i>aktiviert</i>
<i>Unstimulierte Zellen (K)</i>	99.6 ± 17.4	499 ± 32.9	296 ± 31
<i>PHA/PMA</i>	93.5 ± 28.4	432 ± 39.6	236 ± 11.1
<i>PHA/PMA + Phebestin</i>	115 ± 31	567 ± 16.6	369 ± 49.3
	<i>n=7</i>	<i>n=8</i>	<i>n=10</i>

4.1.2.3 Detektion von TGF- β_1 in Zelllysaten mittels Westernblot-Analyse

Nach 24 Stunden Inkubation der regulatorischen T-Zellen, wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Zelllysate wurden für die Durchführung einer Westernblot-Analyse verwendet. Somit konnte TGF- β_1 in regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden. Nach Phebestin-Behandlung wurde ein Anstieg der TGF- β_1 Proteinexpression beobachtet. Sowohl die nicht reduzierte 25 kDa TGF- β_1 Form, als auch die reduzierte 12,5 kDa TGF- β_1 Form ist gegenüber den unstimulierten Zellen deutlich erhöht, wobei die Erhöhung der reduzierten Form signifikant ist (Abb. 11).

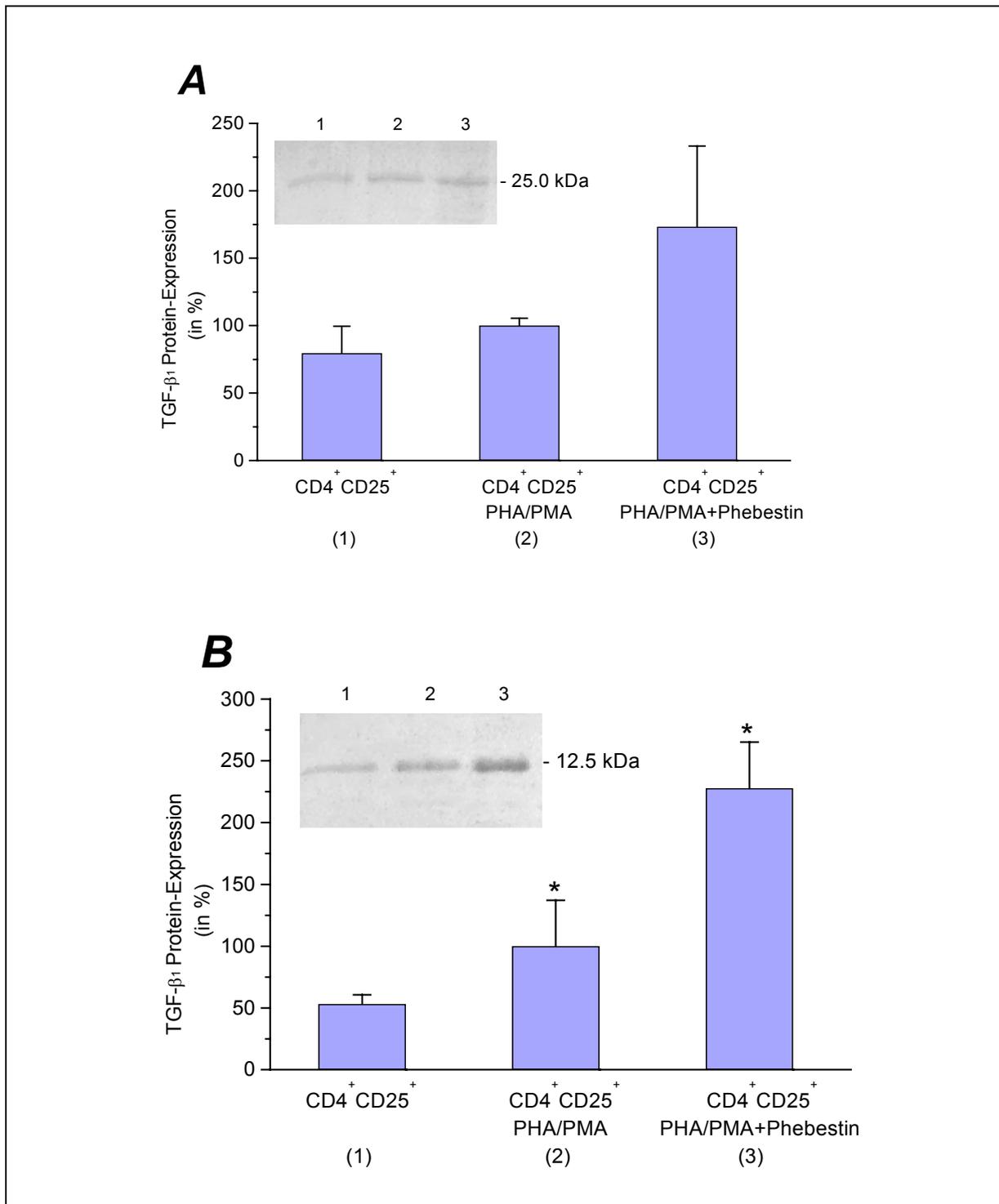


Abb. 11: TGF- β_1 Menge aus Zelllysaten von regulatorischen T-Zellen. Nach 24 Stunden Kultivierung von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurden Zelllysate hergestellt. Anschließend wurden diese in einem 12 %igem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Es sind regulatorische T-Zellen unter verschiedenen Bedingungen aufgetragen: Bahn (1) CD4⁺CD25⁺ Kontrolle, (2) CD4⁺CD25⁺ PHA/PMA (3) CD4⁺CD25⁺ PHA/PMA+Phebestin 10^{-6} M. **A** Die 25 kDa große Bande stellt die nichtreduzierte TGF- β_1 Form dar. **B** Die 12,5 kDa Bande ist die reduzierte TGF- β_1 Form. Im Diagramm ist der Mittelwert \pm SEM aus n=3 unabhängigen Versuchen angegeben. Die Detektion der Banden erfolgte mit dem Gene Profiler. * $p < 0,05$ im Vergleich zu CD4⁺CD25⁺ (1)

4.1.2.4 Detektion von FOXP3 in Zelllysaten mittels Westernblot-Analyse

Nach 24 Stunden Inkubation der regulatorischen T-Zellen, wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Zelllysate wurde für die Durchführung einer Westernblot-Analyse verwendet. Somit konnte FOXP3 in regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden. Nach PHA/PMA Stimulation ist ein deutlicher Anstieg der Expression auf Proteinebene festzustellen (Abb. 12), im Gegensatz zur mRNA-Expression dieser Zellpopulation. Mit Phebestin ist ein deutlich signifikanter Anstieg der FOXP3 Protein-Expression zu verzeichnen. Es wurden mit Phebestin 117 % mehr FOXP3 Protein-Expression, im Vergleich zu unstimulierten regulatorischen Zellen und 51 % mehr Expression im Vergleich zu stimulierten Zellen gefunden. Depletierte MNZ exprimieren kein bzw. in sehr geringen Mengen FOXP3.

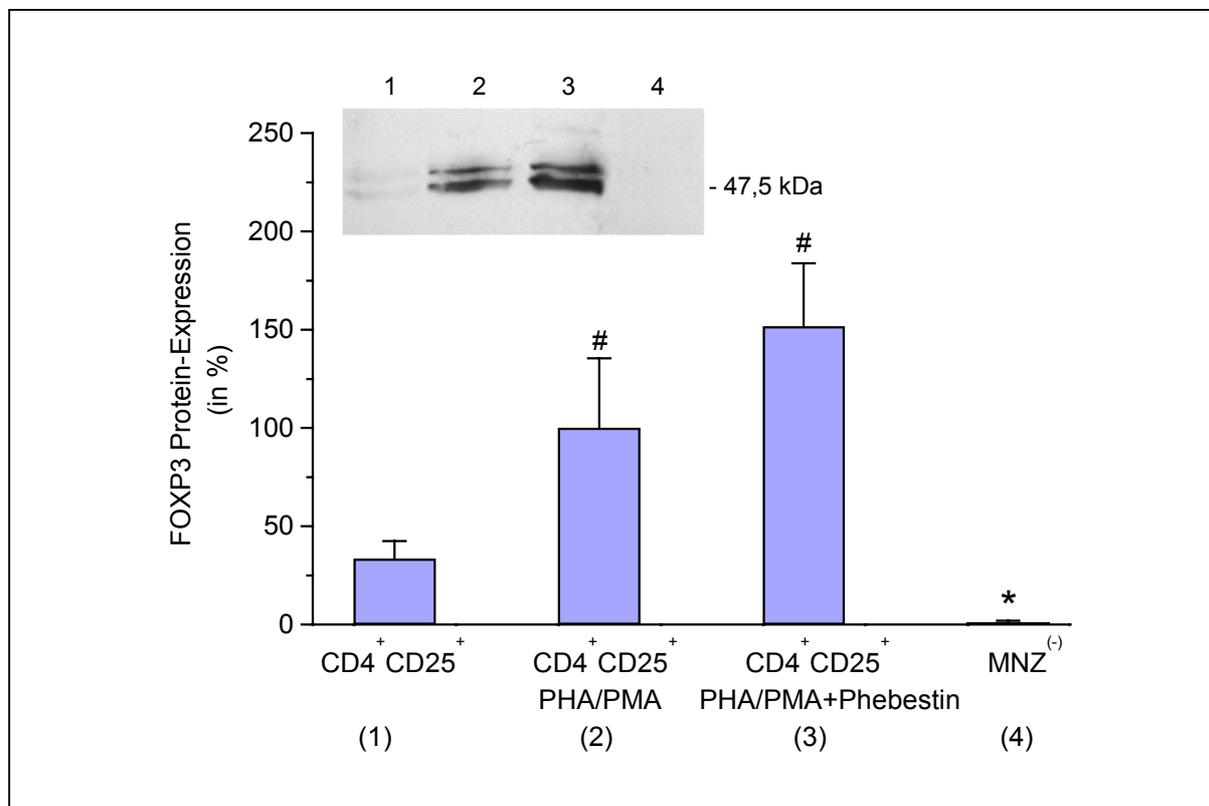


Abb. 12: FOXP3 Menge aus Zelllysaten von regulatorischen T-Zellen. Nach 24 Stunden Kultivierung von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurden Zelllysate hergestellt. Anschließend wurden diese in einem 12 %igem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Es sind regulatorische T-Zellen und MNZ⁽⁻⁾ unter verschiedenen Bedingungen aufgetragen: Bahn (1) CD4⁺CD25⁺ Kontrolle, (2) CD4⁺CD25⁺ PHA/PMA, (3) CD4⁺CD25⁺ PHA/PMA+Phebestin 10⁻⁶ M, (4) MNZ⁽⁻⁾. FOXP3 besitzt eine Größe von 47,5 kDa. Im Diagramm ist der Mittelwert ± SEM aus n=5 unabhängigen Versuchen angegeben. Die Detektion der Banden erfolgte mit dem Gene Profiler. # p<0,01; * p<0,05 im Vergleich zu CD4⁺CD25⁺ (1)

4.2 Auswertung der Ergebnisse des DSS-Maus-Modells für Colitis ulcerosa *in vivo*

Um die Wirkung von regulatorischen T-Zellen und den Aminopeptidase-Inhibitor Phebestin auf eine Autoimmunerkrankung zu untersuchen, wurde das DSS-Maus-Modell für Colitis ulcerosa gewählt. Zuerst wurde mit Hilfe des CellTracker Green CMFDA untersucht, ob die regulatorischen T-Zellen in den Darm der Tiere gelangen. Da dies der Fall war, wurden verschiedene Kombinationen, Konzentrationen und eine unterschiedliche Behandlungsdauer gewählt und im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Untersucht und ausgewertet wurden der Krankheitsgrad (disease activity index), histologische Veränderungen (histologischer Score), Gewichtsveränderungen und die Dickdarmlängen der behandelten DSS-Mäuse. Des Weiteren wurde der mRNA-Gehalt verschiedener, im Krankheitsgeschehen beteiligter Faktoren (TGF- β_1 , FoxP3) im Darmgewebe und in den Splenozyten, untersucht.

4.2.1 Lokalisierung der regulatorischen T-Zellen im Darm der Colitis-Mäuse mittels CellTracker Green (CMFDA)

Um zu untersuchen, ob die regulatorischen T-Zellen in den Darm der Tiere gelangen, wurden diese Zellen vor der Injektion mit dem CellTracker Green CMFDA markiert. 24 Stunden nach Injektion der markierten Zellen wurden die Colitis-Mäuse getötet und die Därme präpariert. Die 10 μm dicken Darmschnitte wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. In Abbildung 13 sind verschiedene Darmschnitte nach (b-f) und ohne (a) Applikation markierter regulatorischer T-Zellen dargestellt.

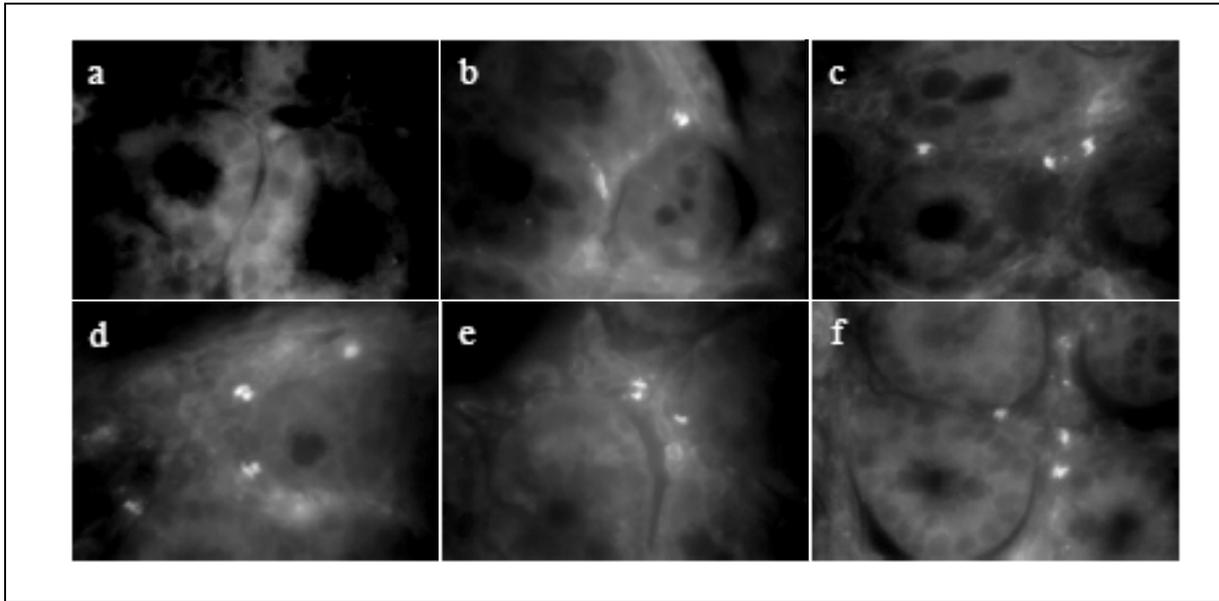


Abb. 13: Darmschnitte der Colitis-Mäuse nach Injektion der CMFDA markierten regulatorischen T-Zellen. Aus der Milz von gesunden Mäusen wurden regulatorische T-Zellen isoliert und mit dem CellTracker CMFDA markiert. Diese Zellen wurden den Colitis-Mäusen am dritten Tag nach DSS Gabe intravenös injiziert. Nach 24 Stunden wurde der Darm entnommen, präpariert und am Fluoreszenzmikroskop untersucht. **(a)** keine Zellen appliziert **(b-f)** CMFDA markierte Zellen appliziert

4.2.2 Injektion von Treg, Phebestin und der Kombination von Treg und Phebestin in DSS-Mäuse

Die einmalige Injektion fand bei allen Tieren dieser Versuchsreihe am Tag 3 statt. Die Versuchsreihe wurde dreimal wiederholt, wobei die Tiere aus zwei Versuchen am Tag 7 getötet wurden und aus dem anderen Versuch am Tag 4 bzw. am Tag 5.

4.2.2.1 Disease activity index

In einer ersten Versuchsreihe wurden neben der Kontrollgruppe drei weitere Tiergruppen am DSS-Modell untersucht. Die Kontrollgruppe bekam am dritten Versuchstag Hanks' Salt Solution intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die anderen Gruppen bekamen entweder Phebestin oder $CD4^+CD25^+$ T-Zellen von gesunden Mäusen injiziert. Der vierten Gruppe wurden mit Phebestin vorbehandelte $CD4^+CD25^+$ T-Zellen verabreicht. Am Tag 3 ist durch die Gabe von Dextran Sulfat bereits ein deutlicher Krankheitsscore zu erkennen, somit wurde die Behandlung am Tag 3 begonnen. Bei den Hanks behandelten Kontrolltieren ist eine tägliche Verschlechterung der Erkrankung zu erkennen und es endet mit einem disease activity index von 8,5 Punkten, welcher einen extremen Schweregrad der Colitis darstellt.

Eine einmalige Injektion von Phebestin am Tag 3 reduziert den disease activity index, sodass am Tag 7 ein maximaler Score von 5,7 Punkten erreicht wurde. Anders als erwartet ist der Score der Gruppe, welcher unbehandelte $CD4^+CD25^+$ T-Zellen injiziert wurden, etwas schlechter. Er liegt am Tag 7 bei 7,7 Punkten, somit jedoch noch unter der Hanks-Kontrolle. Das deutlichste Ergebnis in Bezug auf den disease activity index wurde mit der einmaligen Gabe von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen, welche vorher 45 Minuten mit Phebestin inkubiert wurden, erzielt. Der stark suppressive Effekt ist bis zum Tag 5 am stärksten sichtbar (Tag 5 signifikant). Auch am Tag 7 ist dieser Effekt noch erkennbar, sodass der disease activity index am Tag 7 in dieser Gruppe bei 5,3 Punkten lag.

Durch die Gabe von Phebestin vorbehandelten $CD4^+CD25^+$ T-Zellen wurde eine Verbesserung des disease activity index im Vergleich zur Kontrollgruppe um 37,3 % am Tag 7 dieser Versuchsreihe erreicht (Abb. 14).

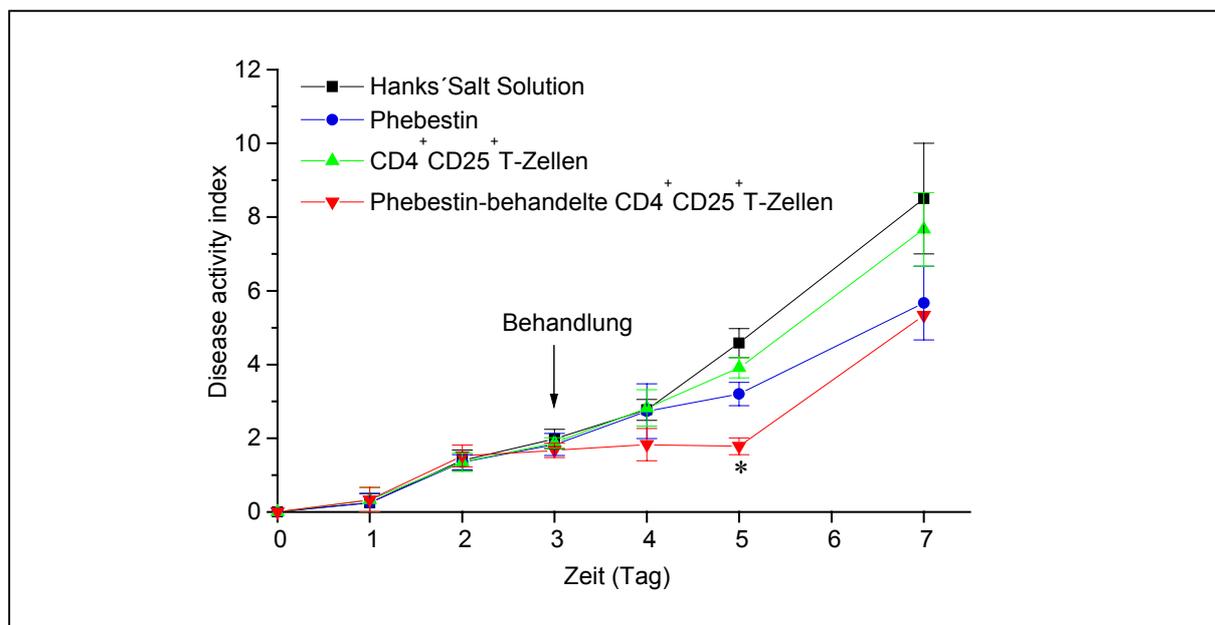


Abb. 14: Disease activity index (DAI). Es wurde vom Tag 0-5 und 7 das Scoring durchgeführt. In den DAI sind die Parameter Gewichtsveränderung, Stuhlkonsistenz und die rektale Blutung zusammengefasst. Am Tag 3 fand die Injektion statt (Gruppe 1: 20 μ l Hanks' Solution, Gruppe 2: 10 μ g Phebestin, Gruppe 3: 10^6 $CD4^+CD25^+$ T-Zellen von gesunden Mäusen, Gruppe 4: 10^6 $CD4^+CD25^+$ T-Zellen mit 10 μ g Phebestin 45 min vorinkubiert). Die Daten repräsentieren den Mittelwerte \pm SEM. Es wurden drei voneinander unabhängig Experimente durchgeführte. Bei zwei Experimenten waren es je 3 Tiere pro Gruppe bis zum Tag 7, bei einem Experiment waren es 10 Tiere pro Gruppe bis zum Tag 4 und 5 Tiere pro Gruppe bis zum Tag 5. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (Hanks)

4.2.2.2 Untersuchung der Dickdarmlängen der DSS-Mäuse

In der Abbildung 15A ist ein weiterer Parameter dargestellt, welcher nicht mit in den disease activity index eingeht. Es sind die durchschnittlichen Darmlängen (Colon) von den Tieren der

vier Gruppen am Tag 4, Tag 5 und Tag 7 dargestellt. Am Tag 4 ist die Darmlänge der Hanks Kontrollgruppe bereits deutlich verkürzt. Die mit Phebestin und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen behandelten Tiere zeigen im Vergleich zu der Kontrollgruppe einen signifikant längeren Darm. Sowohl am Tag 5, in der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen Gruppe und in der mit Phebestin vorbehandelten $CD4^+CD25^+$ T-Zellen Gruppe, als auch am Tag 7. In allen drei Versuchsgruppen ist der Darm länger als in der Hanks Kontrollgruppe. Dies lässt darauf schließen, dass das Ausmaß der Entzündungen geringer war. Die mittlere Ausgangslänge des Darmes lag bei 12 cm. In Abbildung 15B ist das Colon mit Cecum am Tag 4 zu erkennen. Oben liegt der Darm eines Hanks-behandelten Kontroll-Tieres und unten zum Vergleich der Darm eines Tieres aus der mit Phebestin vorbehandelten $CD4^+CD25^+$ T-Zellen Gruppe.

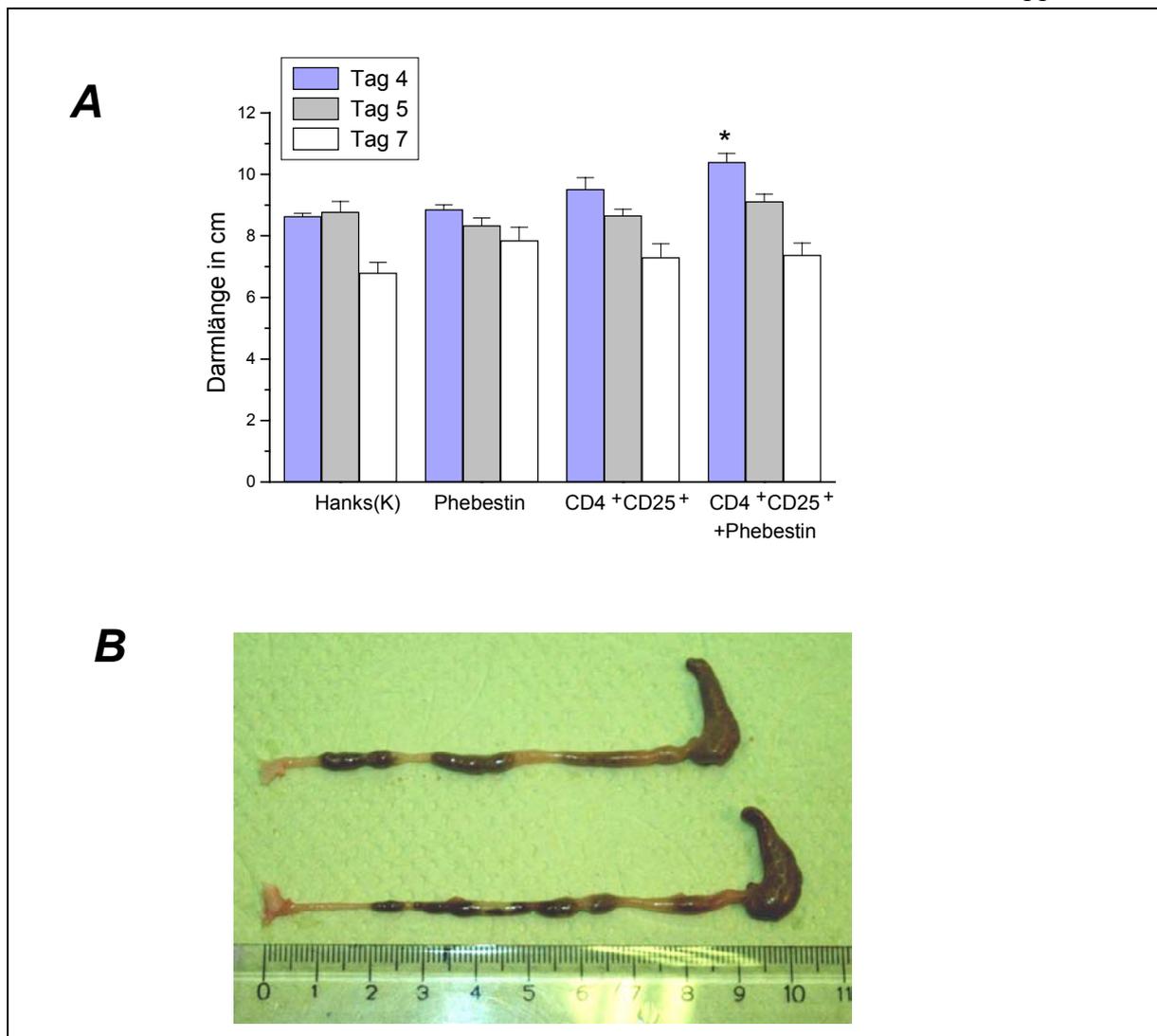


Abb. 15: Dickdarmlängen der behandelten DSS-Mäuse. **A** Aufgetragen sind die Mittelwerte \pm SEM des Versuchstages 4, 5 und 7. Die angegebenen Daten sind aus $n=3$ voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit je 5 Tieren pro Gruppe. **B** Colon mit Cecum am Tag 4. Oben liegt der Darm eines Hanks-behandelten Kontroll-Tieres und unten zum Vergleich der Darm eines Tieres, welchem mit Phebestin vorbehandelte $CD4^+CD25^+$ T-Zellen injiziert wurden. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (Hanks)

4.2.2.3 Histologie und histologischer Score

Die histologische Untersuchung des Darms diente dem Auffinden von pathologischen Veränderungen. Der histologische Scorewert stellt ein Maß für den Schweregrad der CED dar. Die Anfertigung der histologischen Präparate erfolgte wie in Kapitel 3.16 beschrieben und wurde mit Hilfe eines semiquantitativen Scores beurteilt. Diese Arbeit wurde im Institut für Pathologie der medizinischen Universität Magdeburg von einem erfahrenen Pathologen durchgeführt. In Abbildung 17 ist der histologische Score der vier Versuchsgruppen am Tag 4 und 5 dargestellt. Am Tag 4 liegt der histologische Score in der Behandlungsgruppe mit der Kombination aus Phebestin und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen unter 1,7 Punkten. Das bedeutet, dass in den untersuchten Darmschnitten kaum bzw. nur kleine Lymphozytenaggregate sichtbar waren. Ein Darmschnitt dieser Gruppe am Tag 4 zeigt eine weitgehend normale Morphologie mit deutlich reduzierten lokalen Inflammationen (Abb. 16D). Die Hanks Kontrollgruppe weist am Tag 4 mit 2,9 Punkten den höchsten histologischen Score auf. In diesen Gewebeabschnitten wurden mehrere, große Lymphozytenaggregate, teilweise mit Granulozyten, beobachtet. Das mikroskopische Bild des Colons der Hanks Kontrollgruppe am Tag 4 zeigt inflammatorische Infiltrate von mononukleären Zellen und polymorphkernigen Granulozyten in der submukosalen Schicht (Abb. 16A) in 85 % der Gewebeproben. Am Tag 5 zeigt die Gruppe, welche nur mit regulatorischen T-Zellen behandelt wurde, den niedrigsten histologischen Score.

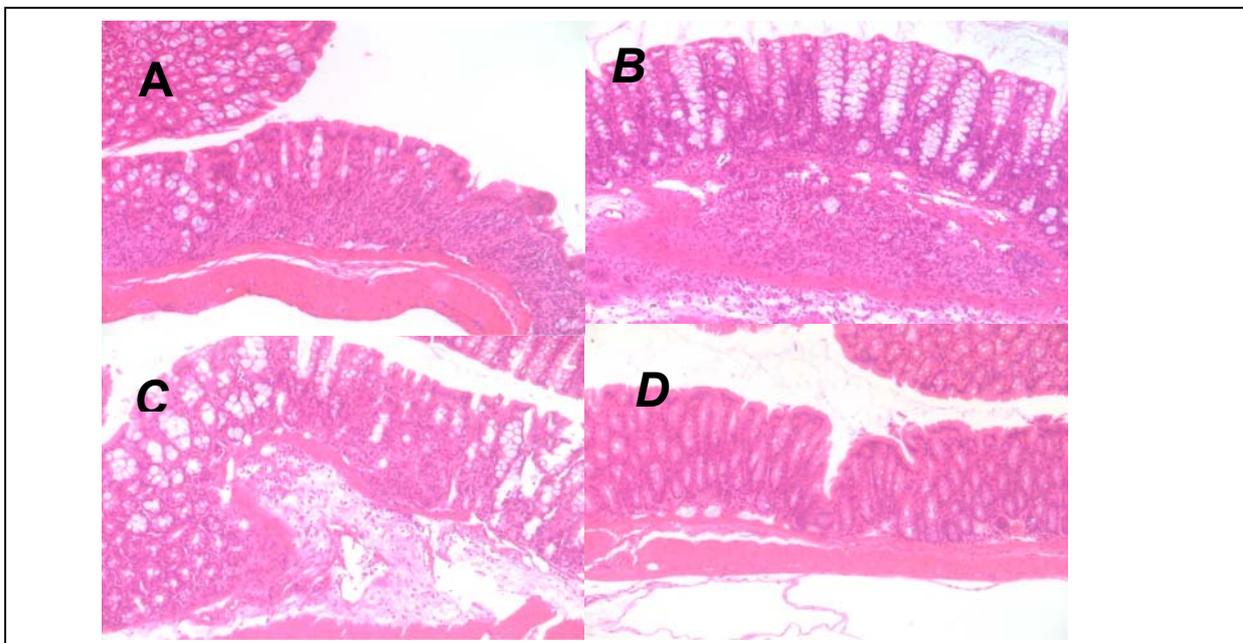


Abb. 16: Histologie des Dickdarmes (Längsschnitte) von Mäusen am Tag 4 mit DSS-induzierter Colitis nach Behandlung mit **A** Hanks (Kontrolle), **B** Phebestin, **C** $CD4^+CD25^+$ T-Zellen, **D** Phebestin vorinkubierte $CD4^+CD25^+$ T-Zellen. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt.

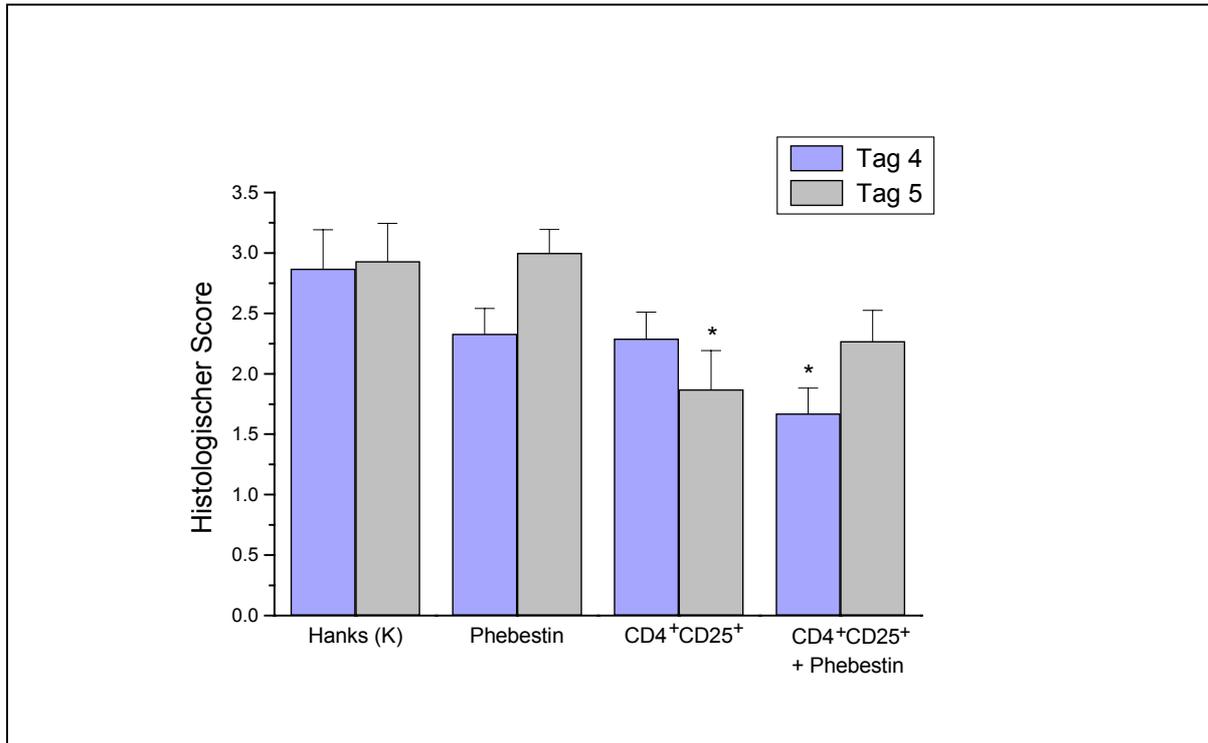


Abb. 17: Im histologischen Score sind die Anzahl der großen Lymphaggregate, die PMN-Infiltrate, granulomartige Entzündungen und Erosionen bewertet worden. Die Darmschnitte vom Tag 4 und 5 wurden ausgewertet. Es sind die Mittelwerte \pm SEM dargestellt mit $n=5$ Tieren pro Gruppe. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (Hanks)

4.2.2.4 Gewichtsveränderungen

Im Rahmen des Scoring wurden die Tiere der jeweiligen Versuchsgruppe über den Zeitraum des Versuches täglich gewogen. Die Gewichtsänderungen, bezogen auf das Ausgangsgewicht (in %), sind in der Grafik 18 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass am Tag 4, dem ersten Tag nach der Behandlung mit Inhibitor, Zellen oder Kombination, eine Gewichtszunahme festzustellen ist. Dagegen ist bereits in der Hanks-Gruppe eine leichte Gewichtsabnahme zu verzeichnen, welche sich bis zum Tag 7 deutlich fortsetzt und zu einem Endverlust von über 10 % vom Ausgangsgewicht führt. Dies entspricht etwa 2 g. Die Kombination aus Zellen und Inhibitor führt insgesamt zum geringsten Gewichtsverlust. Der Gewichtsverlust betrug am Tag 7 ca. 3 %. Auch bei gesunden, unbehandelten Mäusen sind Gewichtsschwankungen von 4 % zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

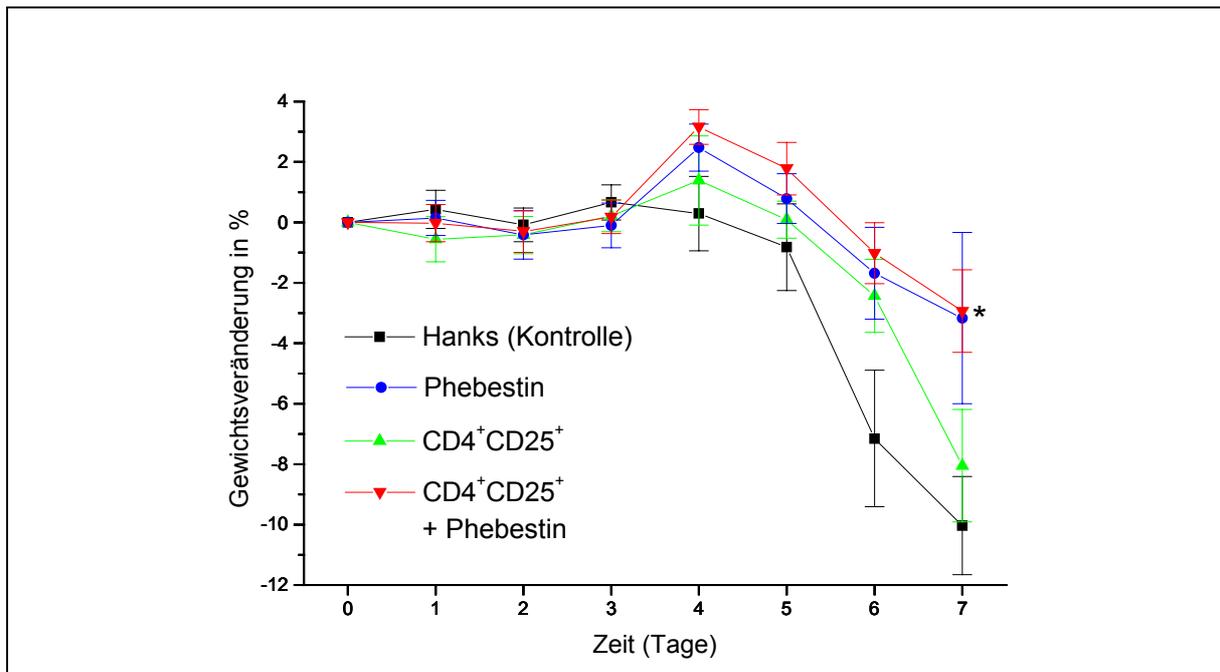


Abb. 18: Effekte verschiedener Behandlungen auf den Gewichtsverlust während der DSS-induzierten Colitis. Der Gewichtsverlust ist angegeben in % bezogen auf das ursprüngliche Gewicht der Mäuse, welche am dritten Tag mit Hanks (Kontrolle), Phebestin, CD4⁺CD25⁺ T-Zellen oder der Kombination aus Phebestin und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen behandelt wurden. Das mittlere Ausgangsgewicht lag bei 20 g. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM. * p=<0,05 im Vergleich zur Kontrolle (Hanks)

4.2.2.5 TGF-β₁ mRNA-Expression im Darm und in den Splenozyten der DSS-Mäuse

Es wurde die lokale Expression von TGF-β₁ im Darmgewebe und in den Splenozyten der Colitis-Mäuse in den vier Versuchsgruppen am Tag 4 und am Tag 5 untersucht. Es ist zu erkennen, dass die Expression der TGF-β₁ mRNA im Darm, 24 Stunden nach Applikation (Tag 4) von Phebestin, CD4⁺CD25⁺ T-Zellen und mit Phebestin behandelten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, verglichen mit der Hanks Kontrolle, deutlich erhöht ist. Die größte Menge an TGF-β₁ mRNA wurde in der Gruppe, welche mit Phebestin-behandelten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen injiziert bekamen, beobachtet (5,8fach mehr gegenüber Hanks). Am Tag 5 (48 Stunden nach Applikation) ist die TGF-β₁ mRNA-Expression verglichen mit Tag 4 deutlich geringer, jedoch im Vergleich mit der Hanks Kontrolle sind die Gruppen, welche regulatorische T-Zellen und die Kombination aus Inhibitor und regulatorischen T-Zellen erhalten haben, signifikant höher (Abb. 19). Die Untersuchung der Splenozyten ergab im Bezug auf die TGF-β₁ mRNA-Expression ein ähnliches Ergebnis. Im Vergleich mit der Hanks Kontrolle ist am Tag 4 in der Phebestin-Gruppe der TGF-β₁ mRNA-Gehalt 4,9 mal höher, bei Injektion von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen ist der Gehalt 24,9 mal höher und bei der kombinierten Gabe von

Inhibitor und Zellen sogar 51,3 mal höher. Am Tag 5 ist in der Kombinationsgruppe nur noch ein 3,4fache Konzentrationserhöhung erkennbar (Abb. 20).

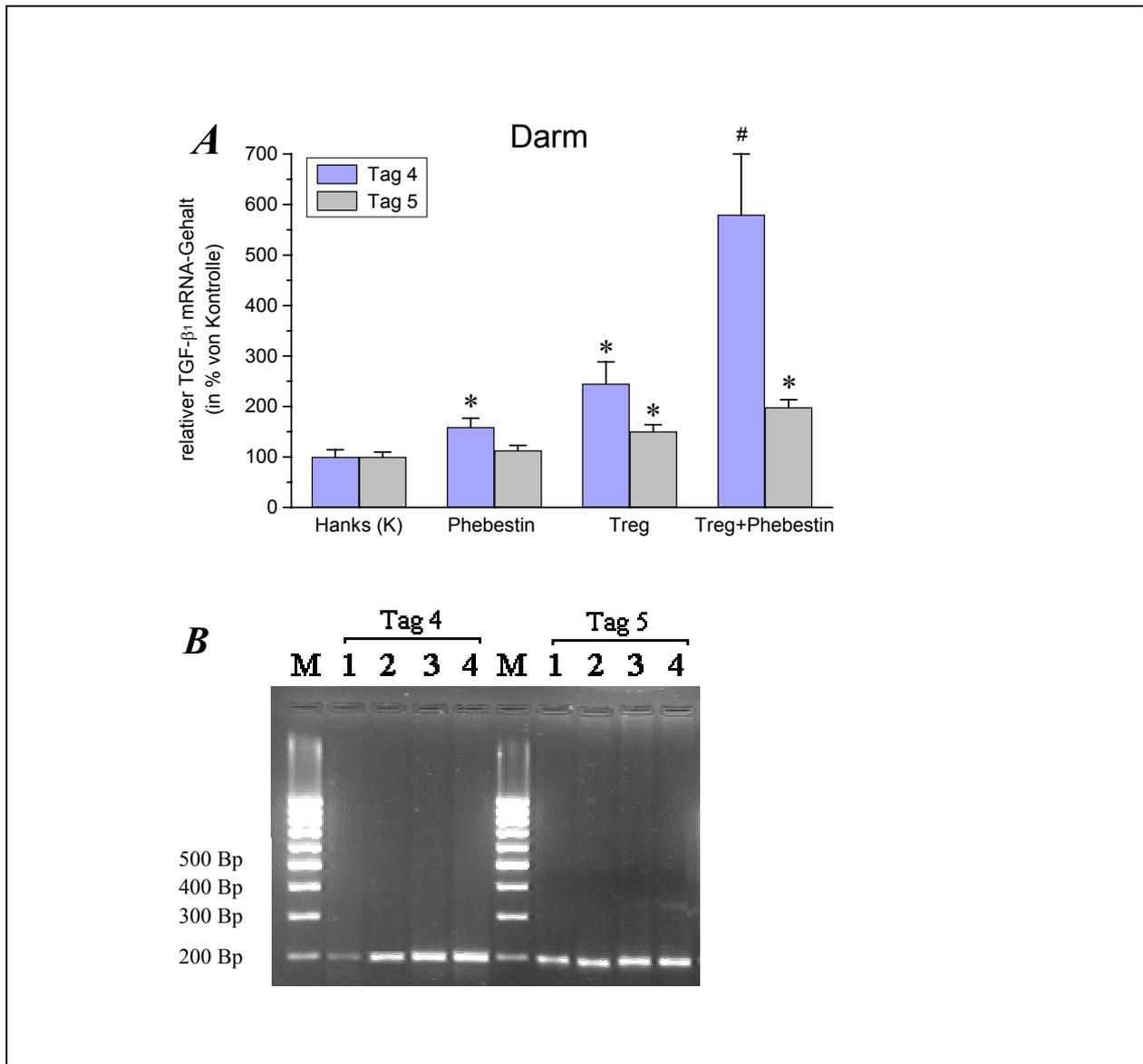


Abb. 19: **A** TGF-β₁ mRNA-Gehalt vom Darmgewebe der Colitis-Mäuse. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit Hilfe des i-Cyclers. Es ist der Mittelwert ± SEM von n=5 Tieren pro Gruppe angegeben. **B** Gelelektrophorese der TGF-β₁ RT-PCR-Produkte (197 Bp). Es wurden 10 µl des PCR-Produktes mit 3 µl „loading dye“ versetzt und auf einem 1,8 %igem Agarosegel aufgetragen. Zuvor wurde das Gel im Ethidiumbromid-Bad gefärbt. Die PCR wurde mit cDNA vom Darm (Colon) der DSS-Mäuse durchgeführt. 1: Hanks' Salt Solution, 2: Phebestin, 3: Treg, 4: Treg + Phebestin. In der Bahn M wurden 5,5 µl des 100 Bp Markers aufgetragen. * p<0,05; # p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle (Hanks)

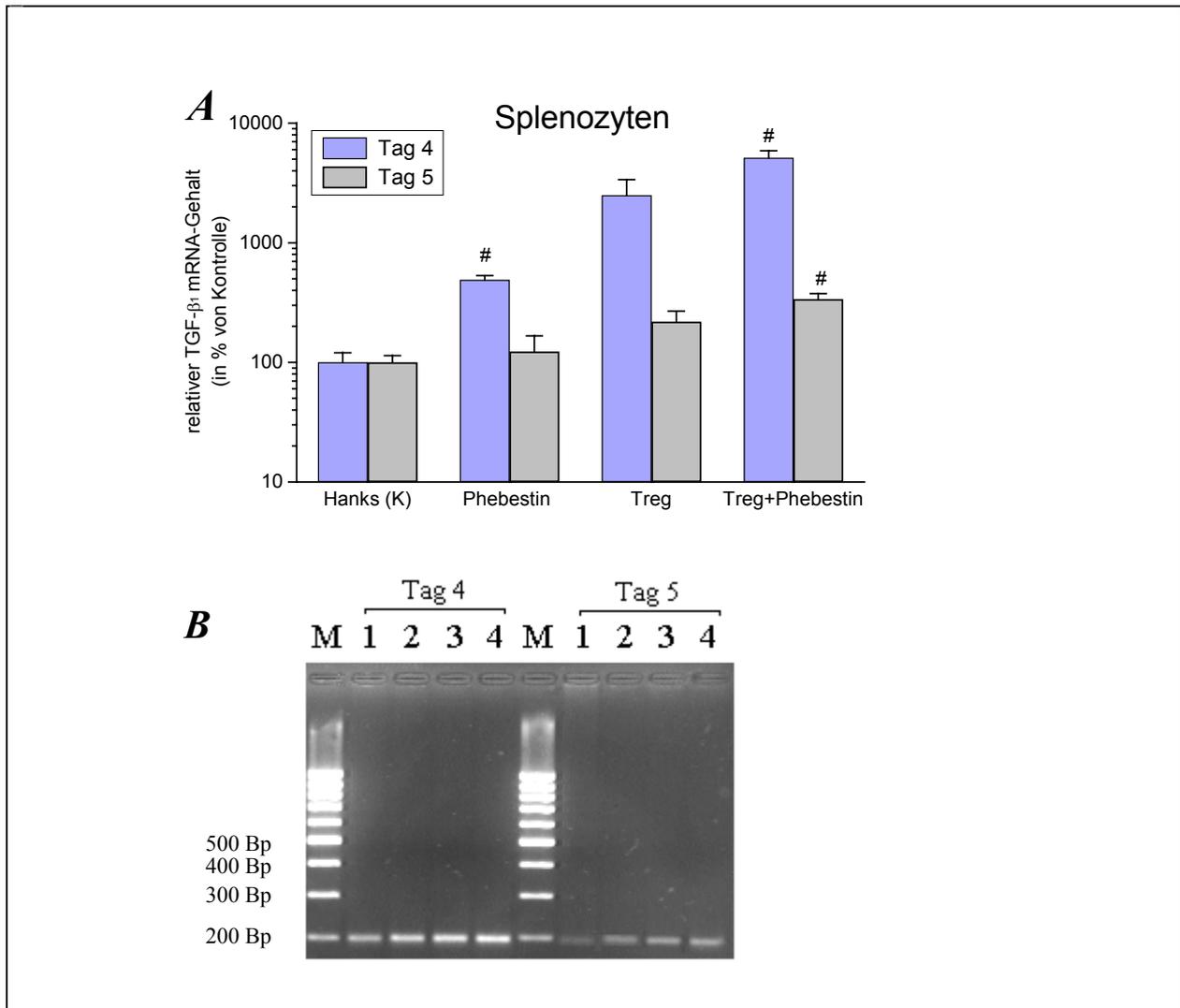


Abb. 20: **A** TGF- β_1 mRNA-Gehalt von den Splenozyten der Colitis-Mäuse. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit Hilfe des i-Cyclers. Es ist der Mittelwert \pm SEM von n=5 Tieren pro Gruppe angegeben. **B** Gelelektrophorese der TGF- β_1 RT-PCR-Produkte (197 Bp). Es wurden 10 μ l des PCR-Produktes mit 3 μ l „loading dye“ versetzt und auf einem 1,8 %igem Agarosegel aufgetragen. Zuvor wurde das Gel im Ethidiumbromid-Bad gefärbt. Die PCR wurde mit cDNA von Splenozyten der DSS-Mäuse durchgeführt. 1: Hanks' Salt Solution, 2: Phebestin, 3: Treg, 4: Treg + Phebestin. In der Bahn M wurden 5,5 μ l des 100 Bp Markers aufgetragen. # $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle (Hanks)

4.2.2.6 TGF- β_1 Konzentration im Plasma der DSS-Mäuse

In Übereinstimmung mit dem mRNA-Gehalt zeigten sich auch die gemessenen TGF- β_1 Konzentrationen im Plasma. Mit 49,8 ng/ml am Tag 4 und 40,9 ng/ml am Tag 5 hatte die Gruppe, welche am Tag 3 mit Phebestin vorbehandelte CD4⁺CD25⁺ T-Zellen injiziert bekam, die größte TGF- β_1 Konzentration aller vier Gruppen aufzuweisen (Abb. 21).

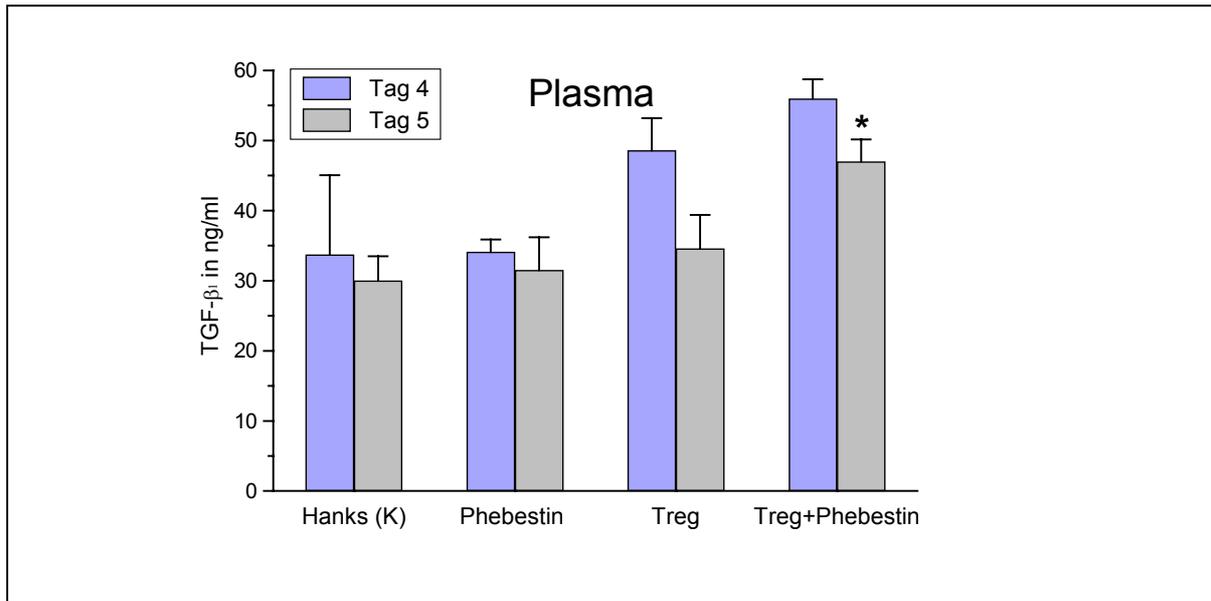


Abb. 21: Bestimmung der TGF-β₁ Konzentration im Plasma der DSS-Mäuse. Es ist der Mittelwert ± SEM von n=4 Tieren pro Gruppe angegeben. * p=<0,05 im Vergleich zur Kontrolle (Hanks)

4.2.2.7 FoxP3 mRNA-Expression im Darm und in den Splenozyten der DSS-Mäuse

Ein klarer Anstieg des FoxP3 mRNA-Level ist sowohl im Darm als auch in den Splenozyten bei allen drei Behandlungsmöglichkeiten im Vergleich zur Hanks-Kontrolle zu erkennen (Abb. 22, Abb. 23). Im Darm sind die Expressionsveränderungen bei FoxP3 am stärksten am Tag 5 ausgeprägt, wiederum waren die Phebestin behandelten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen am effektivsten. Die FoxP3-Expression bei den untersuchten Splenozyten ist am Tag 4 am höchsten, wobei hier alle drei Therapieoptionen (Phebestin, Treg, Treg+Phebestin) zu gleichermaßen erhöhten FoxP3-Werten führten.

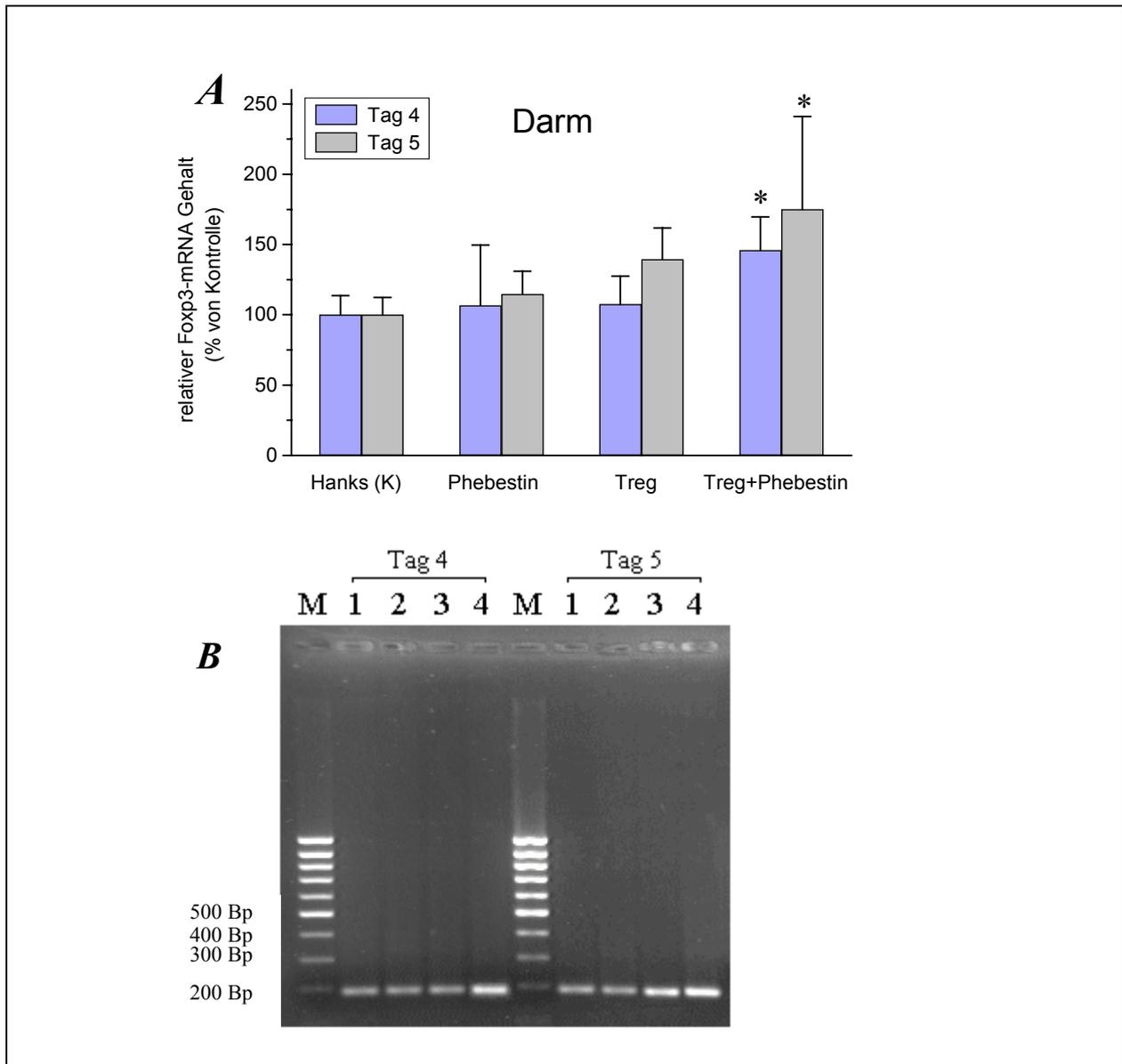


Abb. 22: **A** FoxP3 mRNA-Gehalt vom Darmgewebe der Colitis-Mäuse. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit Hilfe des i-Cyclers. Es ist der Mittelwert \pm SEM von $n=5$ Tieren pro Gruppe angegeben. **B** Gelelektrophorese der FoxP3 RT-PCR-Produkte (183 Bp). Es wurden 10 μ l des PCR-Produktes mit 3 μ l „loading dye“ versetzt und auf einem 1,8 %igem Agarosegel aufgetragen. Zuvor wurde das Gel im Ethidiumbromid-Bad gefärbt. Die PCR wurde mit cDNA vom Darm (Colon) der DSS-Mäuse durchgeführt. 1: Hanks' Salt Solution, 2: Phebestin, 3: Treg, 4: Treg + Phebestin. In der Bahn M wurden 5,5 μ l des 100 Bp Markers aufgetragen. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (Hanks)

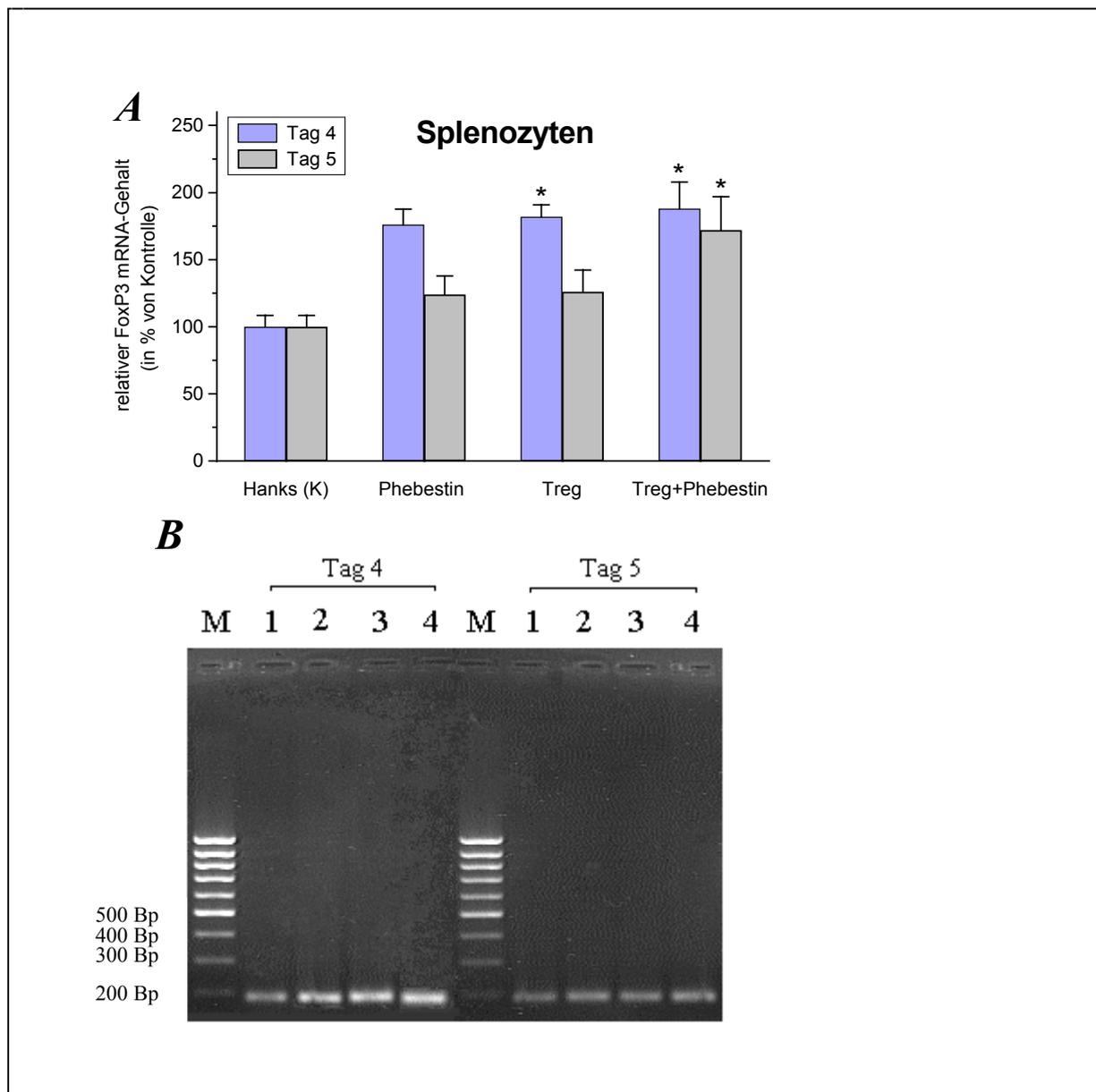


Abb. 23: **A** FoxP3 mRNA-Gehalt von den Splenozyten der Colitis-Mäuse. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit Hilfe des i-Cyclers. Es ist der Mittelwert \pm SEM von $n=5$ Tieren pro Gruppe angegeben. **B** Gelelektrophorese der FoxP3 RT-PCR-Produkte (183 Bp). Es wurden 10 μ l des PCR-Produktes mit 3 μ l „loading dye“ versetzt und auf einem 1,8 %igem Agarosegel aufgetragen. Zuvor wurde das Gel im Ethidiumbromid-Bad gefärbt. Die PCR wurde mit cDNA von den Splenozyten der DSS-Mäuse durchgeführt. 1: Hanks' Salt Solution, 2: Phebestin, 3: Treg, 4: Treg + Phebestin. In der Bahn M wurden 5,5 μ l des 100 Bp Markers aufgetragen. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (Hanks)

4.2.2.8 IL-10 mRNA-Expression im Darm und in den Splenozyten der DSS-Mäuse

Ein deutlicher Anstieg der IL-10 mRNA-Expression ist sowohl im Darmgewebe, als auch in den Splenozyten der behandelten Colitis-Mäuse festzustellen. Die kombinierte Gabe aus

regulatorischen T-Zellen und dem Inhibitor Phebestin erwies sich in beiden Fällen als effektivste Therapie. Die kombinierte Gabe führte im Darm am Tag 4 zu einer etwa dreifach und am Tag 5 zu einer etwa 21fach höheren IL-10 Expression im Vergleich zur Hanks Kontrolle (Abb. 24). Der Unterschied der IL-10 Expression zwischen dem Tag 4 und Tag 5 ist bei den Splenozyten nicht so deutlich. Die IL-10 Expression ist bei der kombinierten Gabe jeweils um etwa das zweifache im Vergleich zur Hanks Kontrolle erhöht (Abb. 25).

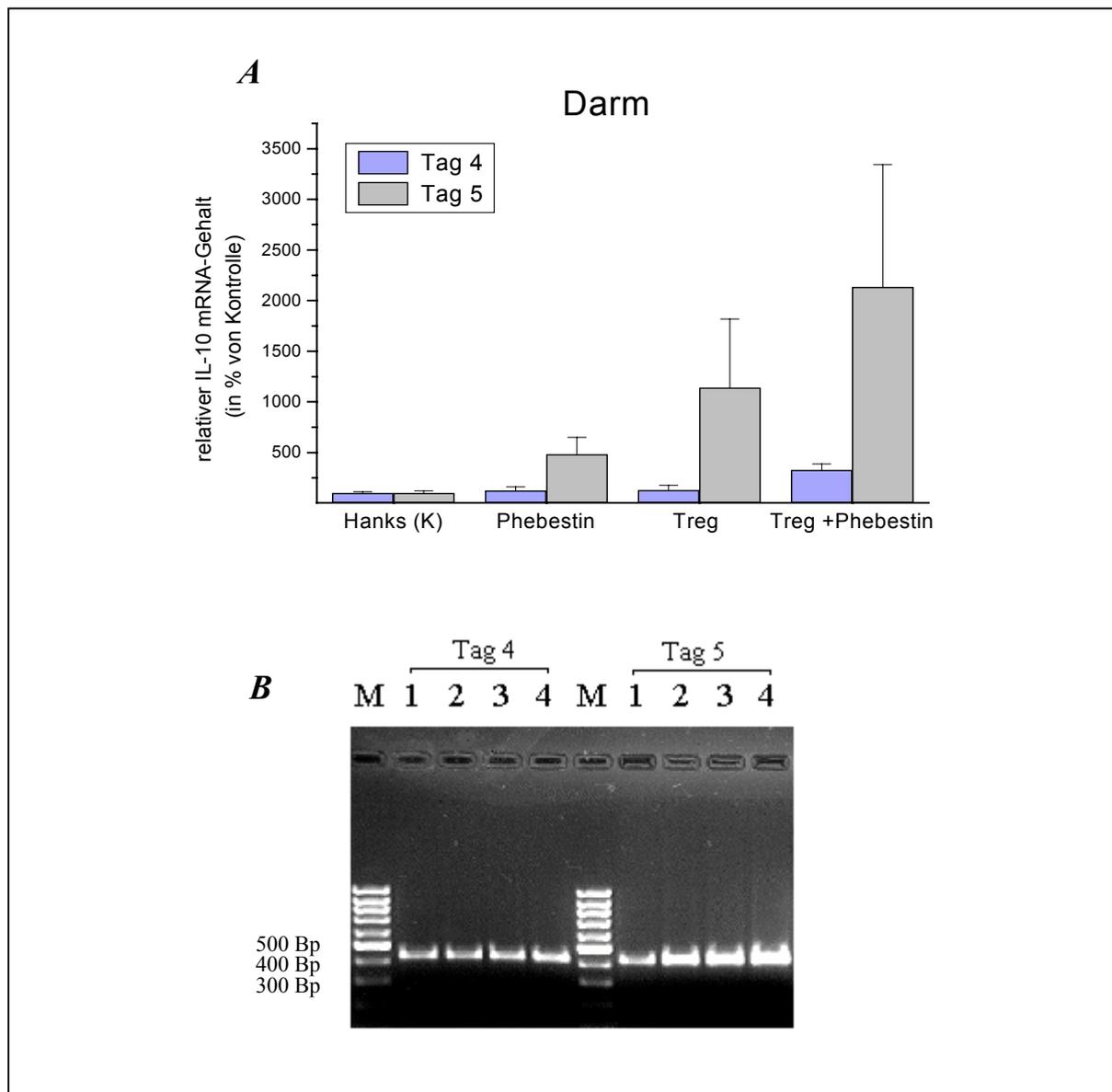


Abb. 24: **A** IL-10 mRNA-Gehalt vom Darmgewebe der Colitis-Mäuse. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit Hilfe des i-Cyclers. Es ist der Mittelwert \pm SEM von $n=3$ Tieren pro Gruppe angegeben. **B** Gelelektrophorese der IL-10 RT-PCR-Produkte (420 Bp). Es wurden 10 μ l des PCR-Produktes mit 3 μ l „loading dye“ versetzt und auf einem 1,8 %igem Agarosegel aufgetragen. Zuvor wurde das Gel im Ethidiumbromid-Bad gefärbt. Die PCR wurde mit cDNA vom Darm (Colon) der DSS-Mäuse durchgeführt. 1: Hanks' Salt Solution, 2: Phebestin, 3: Treg, 4: Treg + Phebestin. In der Bahn M wurden 5,5 μ l des 100 Bp Markers aufgetragen

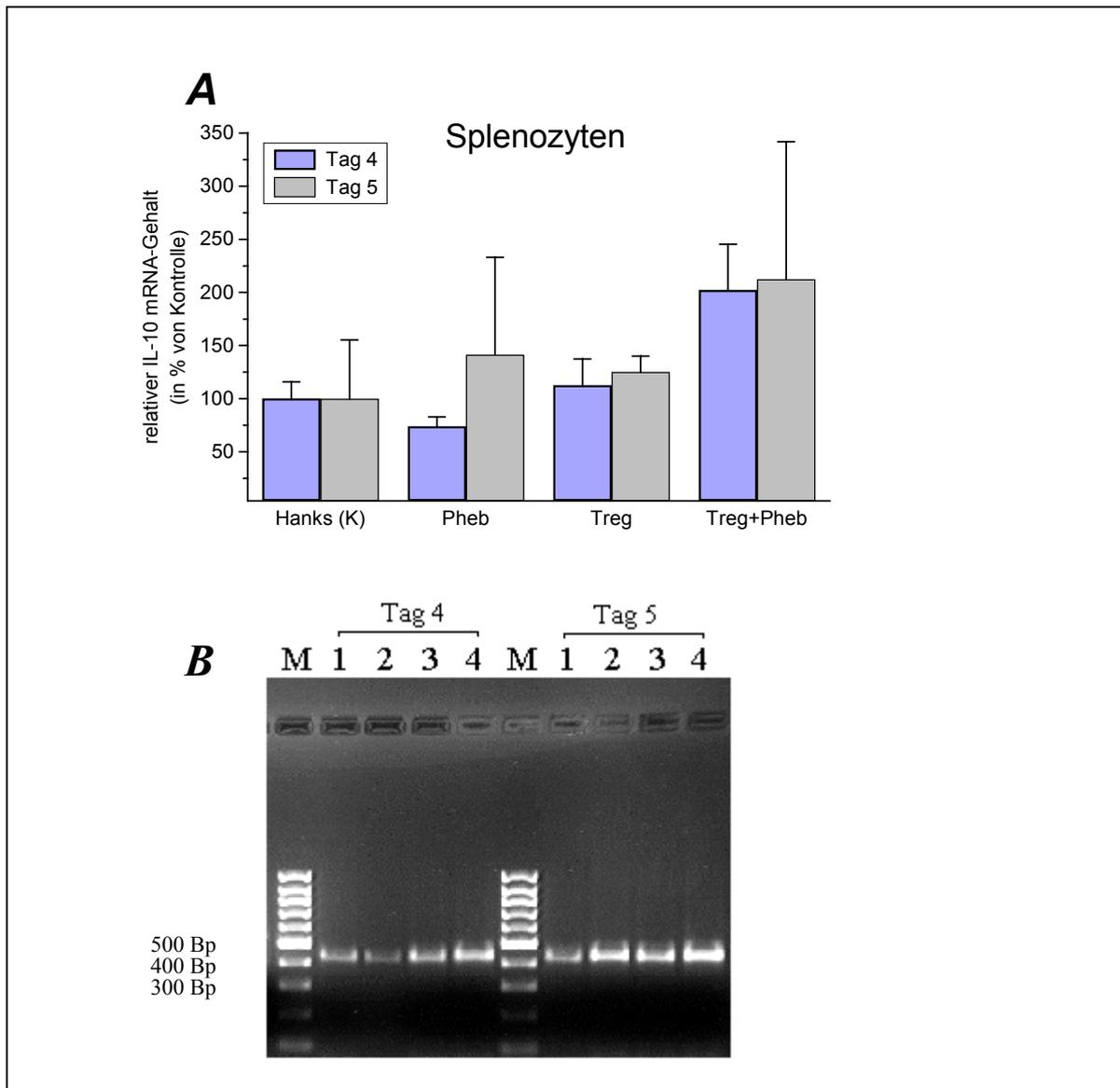


Abb. 25: **A** IL-10 mRNA-Gehalt von den Splenocyten der Colitis-Mäuse. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit Hilfe des i-Cyclers. Es ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=3$ Tieren pro Gruppe angegeben. **B** Gelelektrophorese der IL-10 RT-PCR-Produkte (420 Bp). Es wurden 10 μ l des PCR-Produktes mit 3 μ l „loading dye“ versetzt und auf einem 1,8 %igem Agarosegel aufgetragen. Zuvor wurde das Gel im Ethidiumbromid-Bad gefärbt. Die PCR wurde mit cDNA von den Splenocyten der DSS-Mäuse durchgeführt. 1: Hanks' Salt Solution, 2: Phebestin, 3: Treg, 4: Treg + Phebestin. In der Bahn M wurden 5,5 μ l des 100 Bp Markers aufgetragen

4.2.2.9 T-bet mRNA-Expression im Darm und in den Splenocyten der DSS-Mäuse

Des weiteren wurde die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors T-bet untersucht. Auch hier zeigt sich ein ähnliches Bild. Im Darm als auch in den Splenocyten konnte bei der Gruppe, welchen die mit Inhibitor behandelten Zellen injiziert wurden, die größte T-bet Menge aller vier Gruppen nachgewiesen werden. Die Untersuchung des Darmgewebes zeigte, dass am Tag 4 höhere T-bet mRNA-Gehalte vorliegen (Abb. 26). Bei den Splenocyten ist das

Ergebnis in der Gruppe, in welcher den Mäusen Treg mit Phebestin injiziert wurde, am Tag 5 signifikant am höchsten (Abb. 27).

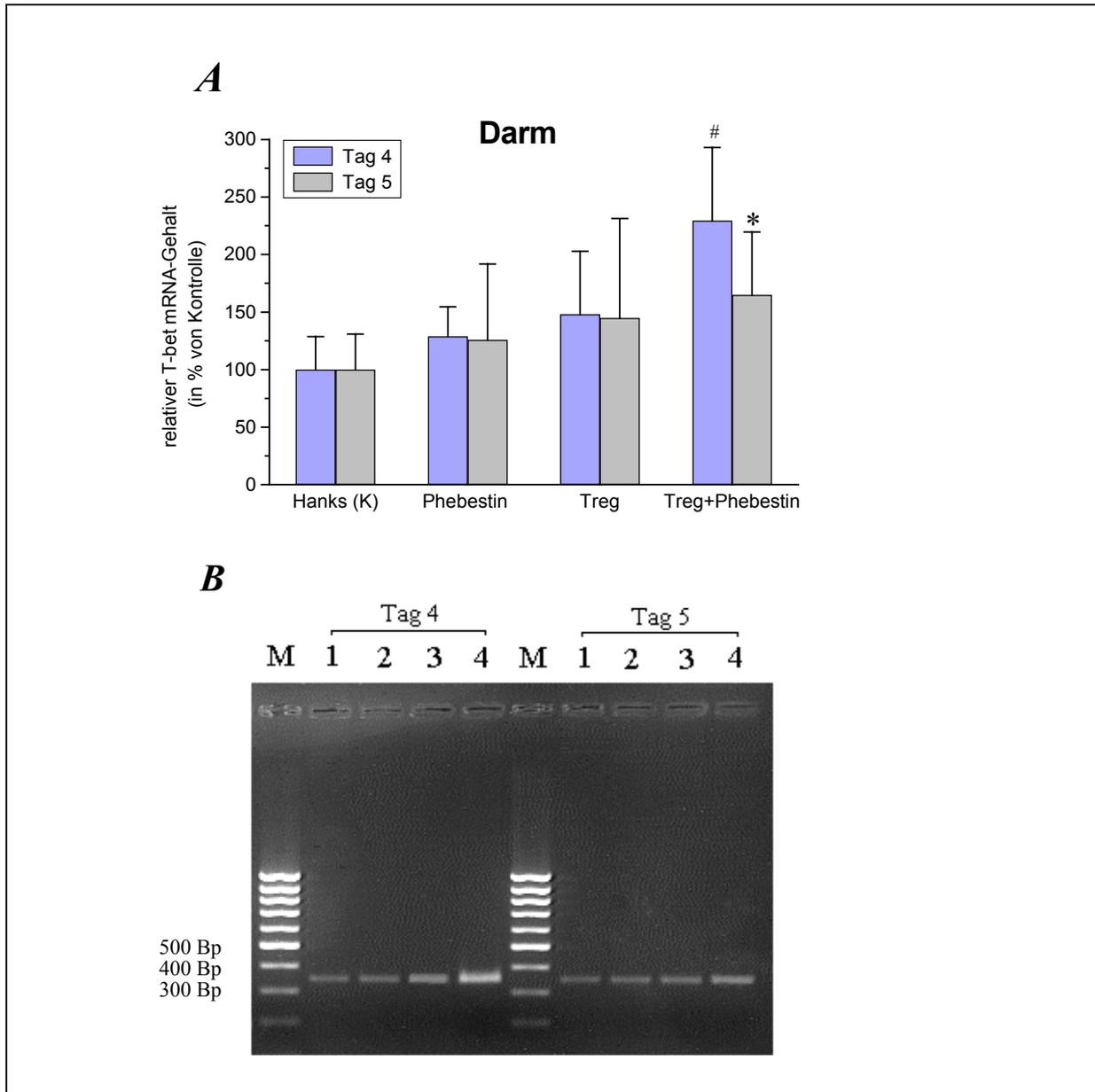


Abb. 26: **A** T-bet mRNA-Gehalt vom Darmgewebe der Colitis-Mäuse. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit Hilfe des i-Cyclers. Es ist der Mittelwert \pm SEM von $n=5$ Tieren pro Gruppe angegeben. **B** Gelelektrophorese der T-bet PCR-Produkte (346 Bp). Es wurden 10 μ l des PCR-Produktes mit 3 μ l „loading dye“ versetzt und auf einem 1,8 %igem Agarosegel aufgetragen. Zuvor wurde das Gel im Ethidiumbromid-Bad gefärbt. Die PCR wurde mit cDNA vom Darm (Colon) der DSS-Mäuse durchgeführt. 1: Hanks' Salt Solution, 2: Phebestin, 3: Treg, 4: Treg + Phebestin. In der Bahn M wurden 5,5 μ l des 100 Bp Markers aufgetragen. $\# < 0,01$; $* p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (Hanks)

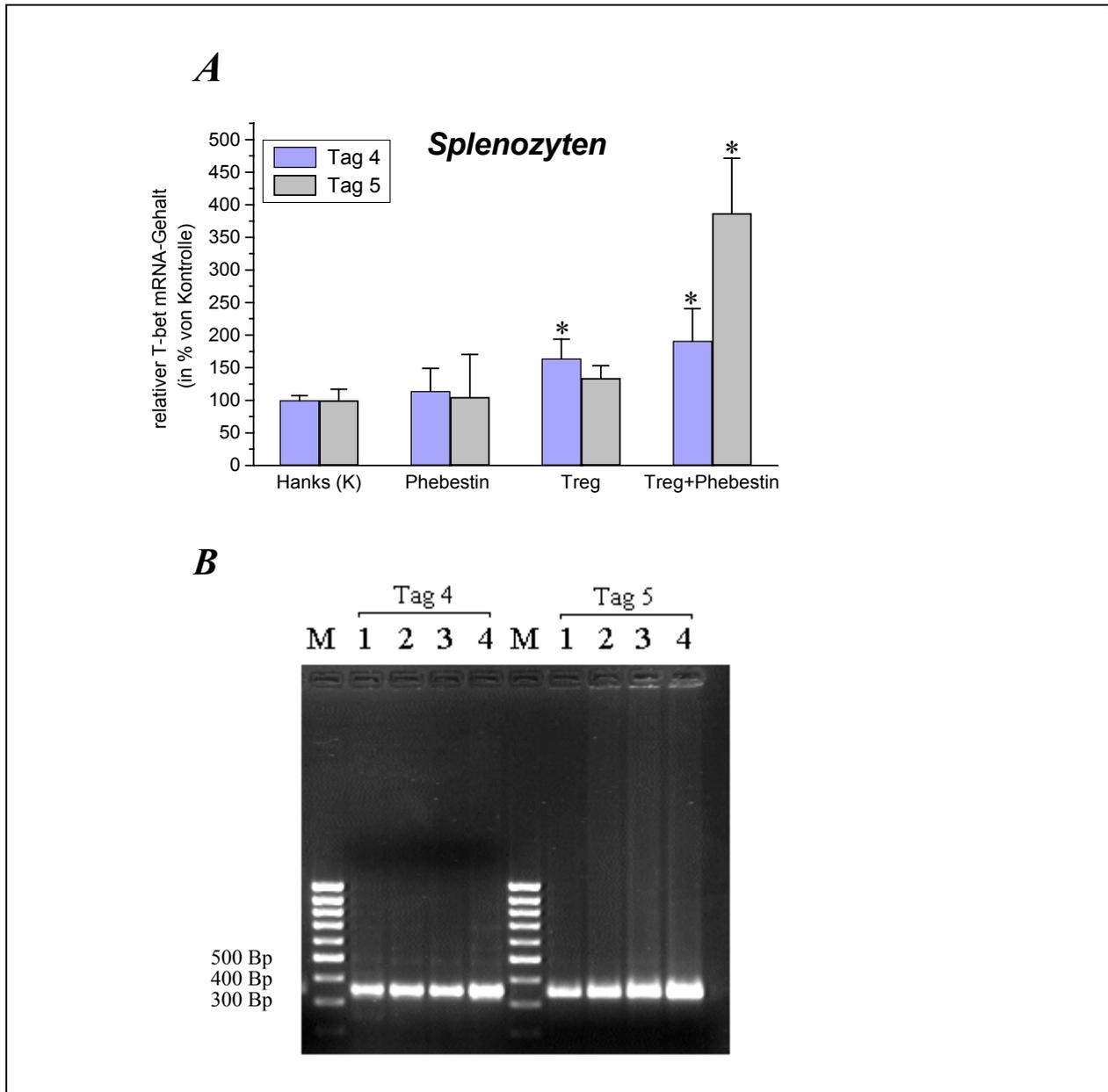


Abb. 27: **A** T-bet mRNA-Gehalt von den Splenozyten der Colitis-Mäuse. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit Hilfe des i-Cyclers. Es ist der Mittelwert \pm SEM von $n=5$ Tieren pro Gruppe angegeben. **B** Gelelektrophorese der T-Bet RT-PCR-Produkte (346 Bp). Es wurden 10 μ l des PCR-Produktes mit 3 μ l „loading dye“ versetzt und auf einem 1,8 %igem Agarosegel aufgetragen. Zuvor wurde das Gel im Ethidiumbromid-Bad gefärbt. Die PCR wurde mit cDNA von den Splenozyten der DSS-Mäuse durchgeführt. 1: Hanks' Salt Solution, 2: Phebestin, 3: Treg, 4: Treg + Phebestin. In der Bahn M wurden 5,5 μ l des 100 Bp Markers aufgetragen. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (Hanks).

4.2.3 Wiederholte Injektionen unterschiedlicher Konzentrationen des Inhibitors Phebestin in DSS-Mäuse

In einer weiteren Versuchsreihe erfolgte die Injektion ab dem zweiten Tag bis zum sechsten Tag entweder einmal täglich mit je 50 µg (Gesamtdosis 250 µg) oder zweimal täglich mit je 50 µg (Gesamtdosis 500 µg). Die Kontrollgruppe erhielt ab dem zweiten Tag zweimal pro Tag PBS. Die Injektionen erfolgten diesmal jedoch i.p., da es nicht möglich war die Substanz über mehrere Tage in die Schwanzvene zu injizieren.

4.2.3.1 Disease activity index

Da die Behandlung mit regulatorischen T-Zellen keine einfache Methode für die Therapie von Colitis-Patienten darstellt, wurden verschiedene Konzentrationen von Phebestin am DSS-Colitis-Maus-Modell untersucht. Die tägliche Gabe von Phebestin, sowohl einmal täglich als auch zweimal täglich, führen ab dem Tag 4 zu einer signifikanten Verbesserung des disease activity index. Der Effekt bleibt bis zum Tag 7 signifikant (Abb. 28)

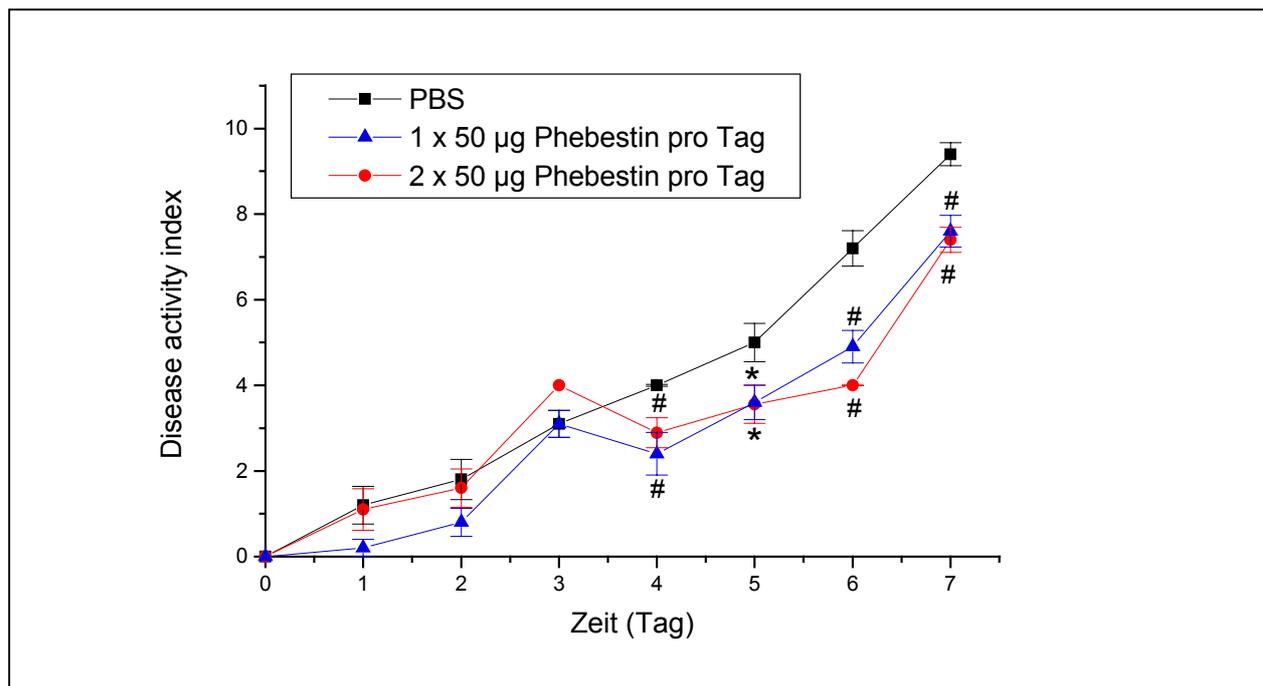


Abb. 28: Disease activity index (DAI) Es wurde vom Tag 0-7 das Scoring durchgeführt. In den DAI sind die Parameter Gewichtsveränderung, Stuhlkonsistenz und die rektale Blutung zusammengefasst. Es fand eine tägliche Injektion von Phebestin statt (Gruppe 1: 2 x täglich PBS, Gruppe 2: 1 x täglich 50 µg Phebestin, Gruppe 3: 2 x täglich 50 µg Phebestin). Die Daten repräsentieren den Mittelwerte \pm SEM. Es waren 10 Tiere pro Gruppe. #= $<0,01$; * $p=<0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (PBS)

4.2.3.2 Gewichtsveränderungen

Im Rahmen des Scorings wurden die Tiere der jeweiligen Versuchsgruppe über den Zeitraum des Versuches täglich gewogen. Die Gewichtsänderungen sind in der Grafik 29 zusammengefasst. Ab dem Tag 6 wurden in der PBS-Kontrollgruppe sehr starke Gewichtsveränderungen festgestellt. Die prozentuale Gewichtsveränderung, vom Ausgangsgewicht der Tiere berechnet, ist bei den beiden Gruppen welche Phebestin injiziert bekamen signifikant niedriger. Am Tag 7 liegt der Mittelwert der 10 Tiere aus der PBS Gruppe bei -10,2 %, sodass gegenüber der 1 x Phebestin Gruppe eine Veränderung von 5,36 % und gegenüber der 2 x Phebestin Gruppe von 6,36 % zu verzeichnen ist.

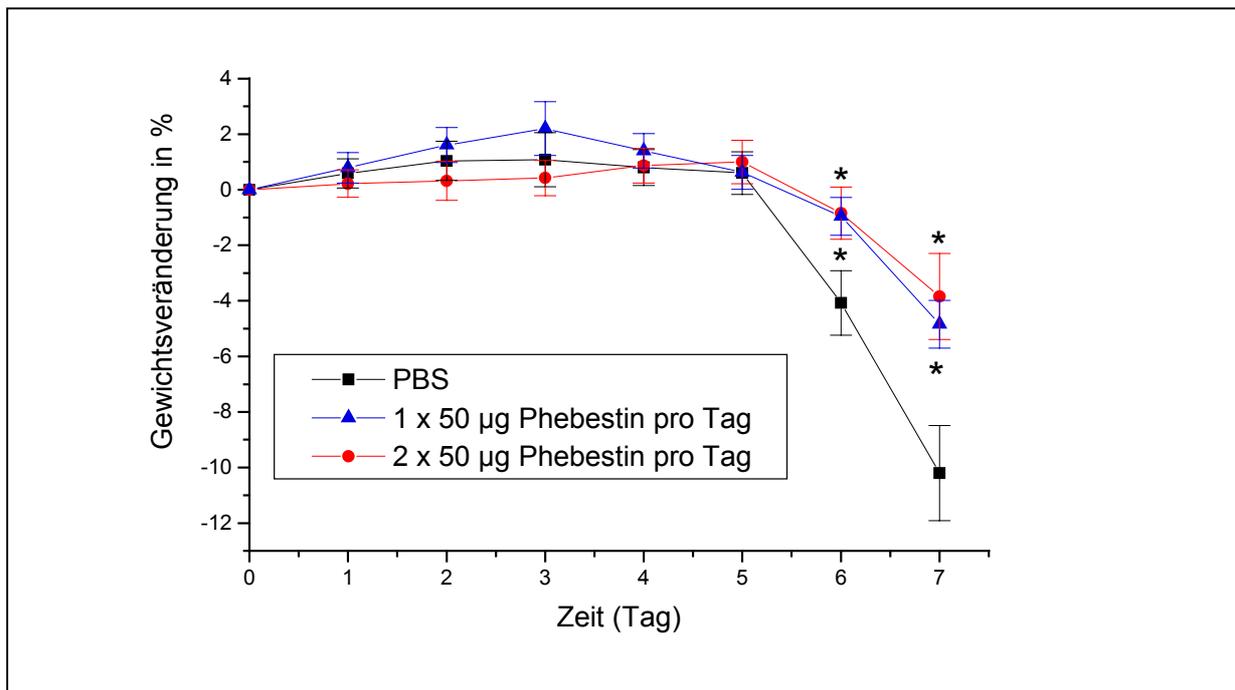


Abb. 29: Effekte verschiedener Behandlungen auf den Gewichtsverlust während der DSS-induzierten Colitis. Der Gewichtsverlust ist angegeben in % des ursprünglichen Gewichts der Mäuse, welche täglich mit PBS (Kontrolle) oder Phebestin (1 x 50 µg oder 2 x 50 µg) behandelt wurden. Die angegebenen Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von 10 Tieren pro Gruppe. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (PBS)

5. Diskussion

5.1 Die Rolle von regulatorischen T-Zellen im Immunsystem

Das Immunsystem besitzt die Fähigkeit zwischen körperfremden, potentiell krankheitsauslösenden und körpereigenen, harmlosen Antigenen zu unterscheiden. Dieses Prinzip wird als Selbsttoleranz bezeichnet und ist entscheidend für den Schutz vor Autoimmunität und der Erhaltung der Immunhomeostase [92]. Die Selbsttoleranz ist charakterisiert durch einige Einzelmechanismen: zentral durch klonale Deletion infolge negativer Selektion im Thymus [93], peripher durch Anergie [94-96], immunologische Ignoranz [97] und Deletion [98].

Regulatorische T-Zellen besitzen eine zentrale Bedeutung für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. Durch Übertragung von regulatorischen T-Zellen können entzündliche Erkrankungen positiv beeinflusst werden, während durch Depletion eine Immunantwort verstärkt wird. Für das Verständnis der molekularen Mechanismen der Suppression und der funktionellen Bedeutung der CD25 Expression gibt es jedoch noch viele offene Fragen. Des Weiteren ist noch nicht genau geklärt wie die regulatorischen Zellen entstehen bzw. welche (Auto-) Antigene sie erkennen. Bei der Entstehung von regulatorischen T-Zellen geht man davon aus, dass sie im Thymus entstehen, in die Peripherie exportiert werden und dort ihre suppressive Funktion ausüben [99;100]. Bisher ist bekannt, dass bei Autoimmunreaktionen weniger regulatorische, dafür mehr entzündungsfördernde T-Zellen vorhanden sind. Regulatorische T-Zellen zeichnen sich durch eine hohe Antigenpezifität aus. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist jeder Treg-Klon gegen ein spezielles Antigen gerichtet und kann somit autoreaktive T-Zellen der gleichen Antigenpezifität inhibieren. Bei Autoimmunerkrankungen geht diese Funktion der Treg verloren. Ob die regulatorischen Zellen bereits im Thymus antigenspezifisch sind muss noch geklärt werden.

Eine mukosale Inflammation kann entstehen, wenn eine Störung der Homeostase zwischen regulatorischen und Effektor-T-Zellen (T_H1/T_H2) vorliegt. Einerseits kann die Anzahl der Effektor-Zellen erhöht sein oder andererseits ist die Antwort der regulatorischen T-Zellen zu schwach. Auf Zytokinebene bedeutet das, dass die Balance zwischen $IFN-\gamma/IL-4$ - und $TGF-\beta$ -Aktivität die chronische intestinale Inflammation kontrolliert [101]. Die Herstellung des Gleichgewichtes könnte erreicht werden, indem die Sekretion proinflammatorischer Zytokine unterdrückt wird oder indem die Bildung anti-inflammatorischer Zytokine stimuliert bzw. substituiert wird.

5.2 Suppressive Aktivität von regulatorischen T-Zellen

Nach Aktivierung von T-Zellen bzw. MNZ finden eine Reihe biochemischer Prozesse statt, welche über mehrere Stadien des Zellzyklus zur Proliferation der Zellen führen. Regulatorische $CD4^+CD25^+$ T-Zellen sind durch ihre suppressive Aktivität charakterisiert, mit der sie die Proliferation anderer Zellen unterdrücken. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MNZ, welchen die $CD25^+$ Zellen depletiert wurden ($MNZ^{(-)}$) eine signifikant höhere Proliferationsrate aufweisen als die nicht depletierten MNZ, in denen die Treg noch enthalten sind. Das Wachstum der $MNZ^{(-)}$ wurde durch die Anwesenheit der $CD25^+$ Regulatorzellen reduziert. Durch eine unterschiedliche Anzahl an zugegebenen Treg zur $MNZ^{(-)}$ Kultur konnte dieser Effekt ebenfalls beobachtet werden.

Ein weiteres Phänomen ist, dass regulatorische T-Zellen offenbar nach Aktivierung mit PHA/PMA ihre suppressive Wirkung verlieren. Jedoch haben zwei Arbeitsgruppen berichtet, dass die suppressive Aktivität *in vitro* von IL-2 abhängig ist und dass die Anwesenheit eines IL-2 neutralisierenden Antikörpers diesen Effekt aufhebt [102;103]. Analysen von IL-2 oder IL-2-Rezeptor-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass IL-2 nicht als essentieller Wachstumsfaktor für T-Zellen *in vivo* beteiligt ist und dass Immunantworten auch in der Abwesenheit von IL-2 effektiv stattfinden [104].

Wir konnten beobachten, dass IL-2 mRNA erst nach Aktivierung nachzuweisen ist und die suppressive Aktivität nach PHA/PMA-Aktivierung verloren geht. Dies könnte bedeuten dass ein „Switch“ in Richtung T_H1 -Zellen stattfindet. Infolge dessen ist die Balance zwischen Treg und Effektor-Zellen gestört und die Entstehung von chronischen Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen wird gefördert. Aufgrund dieser Beobachtungen ist die Applikation von mAAP-Inhibitoren wie z.B. Phebestin, welche die aktivierungs-abhängigen Veränderungen der Treg-Expression und -Funktion aufheben bzw. deutlich abschwächen können, von besonderer Bedeutung.

Eine wichtige Rolle für den Schutz und bei der Verstärkung der suppressiven Aktivität von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen scheint der Alanin-Amino-peptidase-Inhibitor Phebestin zu spielen. Dies bestätigen sowohl die durchgeführten *in vitro* als auch *in vivo* Experimente. Der *in vitro* durchgeführte Proliferationsversuch zeigte, dass durch Vorinkubation (30 Minuten) des Inhibitors Phebestin mit den Treg die depletierten MNZ stärker an der Proliferation gehindert werden. Somit wurde durch die Applikation des mAAP-Inhibitors die suppressive Aktivität der Treg gesteigert. Die Arbeitsgruppe von A. Scheffold zeigte mit Hilfe eines

durchflusszytometrischen Analysesystems, welches die Veränderungen sowohl von Zielzellen als auch von regulatorischen T-Zellen bestimmt, dass regulatorische Zellen in Anwesenheit von Zielzellen eine stark erhöhte Expression von Aktivierungsmolekülen, wie z.B. CD69 und IL-2-Rezeptor aufweisen [105;106].

Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Immunsuppression sind wenig verstanden, MAP Kinase Erk1/2 und der Wnt-Weg scheinen an diesem Prozess beteiligt zu sein.

Weiterhin scheint festzustehen, dass bei der Suppression ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen Suppressor und Effektor T-Zelle benötigt wird. Dabei spielen CTLA-4/CD80- bzw. CTLA-4/CD86-Interaktionen eine wichtige Rolle.

5.3 Die Rolle von mAAP und mAAP-Inhibitoren bei Autoimmunerkrankungen

Die mAAP (CD13) Expression ist in inflammatorischen Erkrankungen und bei verschiedenen Tumoren dysreguliert. Die Überexpression von mAAP (CD13) in T-Lymphozyten oder neutrophilen Zellen ist bei schweren inflammatorischen Erkrankungen (chronischer Schmerz, rheumatoid Arthritis, Multiple Sklerose, systemischer Lupus erythematoses, Polymyositis/Dermatomyositis, Lungen-Sarkoidose) beteiligt [107-109].

Aus einer großen Anzahl von mAAP-Inhibitoren (z.B. Actinonin, Amastatin, Bestatin, Probestin), wurde für die durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Experimente der mAAP-Inhibitor Phebestin gewählt. Phebestin ((2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-L-valyl-L-phenylalanin) ist ein Tripeptid welches von *Streptomyces sp.* MJ716-m3 produziert wird [30]. Für die Aktivität von Phebestin ist die Konfiguration (2S,3R) ausschlaggebend [110]. In Zellkulturmodellen wurde bereits gezeigt, dass Bestatin, Probestin und Actinonin das Wachstum von humanen T- und B-Lymphozyten inhibieren können [13;111]. In eigenen Vorarbeiten wurde dieses Ergebnis bestätigt und es wurde gezeigt, dass auch Phebestin in der Lage ist, T-Zellen am Wachstum zu hindern (Daten nicht gezeigt). Im Rahmen dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass in einem Kokultur-Modell mit depletierten MNZ und regulatorischen T-Zellen die Proliferation von der Anzahl der regulatorischen T-Zellen abhängt und bei Zusatz von Phebestin die Proliferation noch weiter gehemmt wird. Die Hemmung des Zellwachstums, durch die mAAP-Inhibitoren induziert, korreliert mit der Freisetzung von proinflammatorischen (IL-2) und immunsuppressiven Zytokinen (TGF- β) [13;112]. Probestin reduziert den aktivierungsabhängigen Anstieg von IL-2 mRNA in

T-Zellen. Im Gegensatz dazu induziert Probestin und auch Actionin die TGF- β mRNA-Expression [13]. Phebestin erwies sich hier als effektivster Inhibitor in Bezug auf die TGF- β mRNA-Expression.

Zwei zelluläre Mechanismen scheinen bei der Vermittlung der mAAP-Signale in den Zellkern beteiligt zu sein. Zum einen der MAP-Kinase Erk1/Erk2-Weg, wobei durch Aminopeptidase-Inhibitoren ein Anstieg der Expression und der Aktivität erfolgt [113]. Zum anderen üben mAAP-Inhibitoren einen Effekt auf die Expression und die Aktivität auf Komponenten, welche im Wnt-Signalweg beteiligt sind (Wnt-5a und Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β)), aus [114].

In verschiedenen Tiermodellen wurde bereits gezeigt, dass Aminopeptidase-Inhibitoren einen positiven Einfluss auf unterschiedliche Erkrankungen aufweisen. Bestatin führt in einem *in vivo* Modell zu einer Inhibierung des Wachstums von Tumorzellen [115;116]. Mehrere Studien in Mäusen zeigten, dass Bestatin anti-infektiöse Eigenschaften ausübt, durch die Erhöhung der Resistenz gegen bakterielle, virale oder fungale Infektionen. Damit verbunden ist die Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten [117-119].

In der Literatur wurden bereits mehrere Tiermodelle, welche sich mit der CED und deren Therapiemöglichkeiten beschäftigen, diskutiert. Jedoch ist noch sehr wenig über Treg im Tiermodell für Colitis ulcerosa bekannt. Somit war ein Ziel dieser Arbeit die Eigenschaften von regulatorischen T-Zellen im DSS-Maus-Modell zu untersuchen.

5.4 Charakterisierung regulatorischer T-Zellen auf mRNA-Ebene

FOXP3 und TGF- β sind bekannt als wichtige Mediatoren der suppressiven Aktivität. Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass FOXP3 essential für die Entwicklung und funktionale Aktivität der regulatorischen T-Zellen, sowohl in der Maus als auch im Menschen, ist [40-42;90].

FOXP3 gehört zur forkhead Transkriptionsfaktor Familie. Es wurden 15 Klassen der FOX (forkhead box) Proteine definiert, wobei die Einteilung aufgrund der Struktur, nicht jedoch aufgrund der Funktion erfolgt. Gekennzeichnet sind die Proteine durch eine forkhead-DNA-bindende Domäne (FKH). Die FKH Domäne von FOXP3 ist nah am carboxyterminalen Ende lokalisiert [120]. Neben der forkhead Domäne enthält das Protein einen Cys₂His₂ Zink-Finger

und offensichtlich ein „coiled-coil“ Leucin-Zipper-Motiv [121]. Die FOXP3 Homologie zwischen Menschen, Mäusen und Ratten ist sehr hoch. Das Protein wurde im Zusammenhang mit Toleranz und Autoimmunität diskutiert, da eine Mutation die Entstehung des autoimmunen Syndroms IPEX/XLAAD (Immundefizienz-, Polyendokrino- und Enteropathie-verursachendes X-gekoppeltes Syndrom) auslöst [122]. Die Symptome der Erkrankung sind Diarrhoea, Dermatitis, Insulin-abhängiger Diabetes Mellitus, Thyreoiditis und Anämie. Studien haben ergeben, dass die mutierte Region auf dem X-Chromosom (Xp11.23) lokalisiert ist und dem *sf* Gen in Mäusen entspricht [122-124]. Hori et al. und Fontenot et al. haben beschrieben, dass für die Aktivität der Treg die Expression von FOXP3 essentiell ist. Um ruhenden T-Zellen in regulatorische Zellen zu konvertieren wird die Expression von FOXP3 benötigt [40;42;121]. Die Arbeitsgruppe von Karagiannidis zeigte, dass es *in vivo* eine funktionelle Verbindung zwischen FOXP3 und IL-10 gibt [125]. Diese Erkenntnisse können für die Entwicklung neuer Therapien von Bedeutung sein. Die FOXP3 Expression kann durch Estrogen in CD4⁺ Zellen induziert werden, möglicherweise durch die direkte Interaktion des Estrogen-Rezeptors mit den FOXP3-Promotor [120]. Des Weiteren ist auch eine Verbindung zwischen FOXP3 und IL-2 beschrieben worden. Eine geringe IL-2 Produktion in Jurkat-Zellen führt zum Anstieg der FOXP3-Expression [126]. Diesen Zusammenhang konnten wir auch bei regulatorischen T-Zellen beobachten. Unstimulierte Treg, welche kein IL-2 exprimieren, zeigten eine deutlich höhere FOXP3-Expression als stimulierte Zellen. Mehrere Autoren konnten bereits zeigen, dass die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen zu einem signifikanten Abfall von FOXP3 mRNA führt [40-42]. Phebestin hebt die stimulationsabhängige Abnahme der FOXP3 Expression teilweise wieder auf. Dies ist auch in Übereinstimmung mit der IL-2 mRNA Abnahme in stimulierten Zellen mit Phebestinzusatz zu sehen. Phebestin zeigt somit einen stabilisierenden Effekt auf den suppressiven Phänotyp von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen.

Im Thymus unterliegen CD4-Zellen einer positiven Selektion, die CD4⁺FOXP3⁻ Zellen verlassen den Thymus als naive CD45RB^{high} CD25⁻ Zellen. Wenn diese Zellen in der Peripherie ein aktivierendes Signal erhalten, sind sie gekennzeichnet durch einen geringen CD45 Level und durch eine hohe CD25 Expression (CD45^{low} CD25⁺). Zur Differenzierung und Festlegung als Treg im Thymus werden ebenfalls aktivierende Liganden benötigt. Treg verlassen den Thymus mit einem FOXP3⁺CD25⁺CD45RB^{low} Phänotyp. Die FOXP3 Expression wird in der Peripherie beibehalten. Wenn spezifische aktivierende Signale fehlen, kann es zum Verlust der CD25 Expression kommen (Abb. 30)[127].

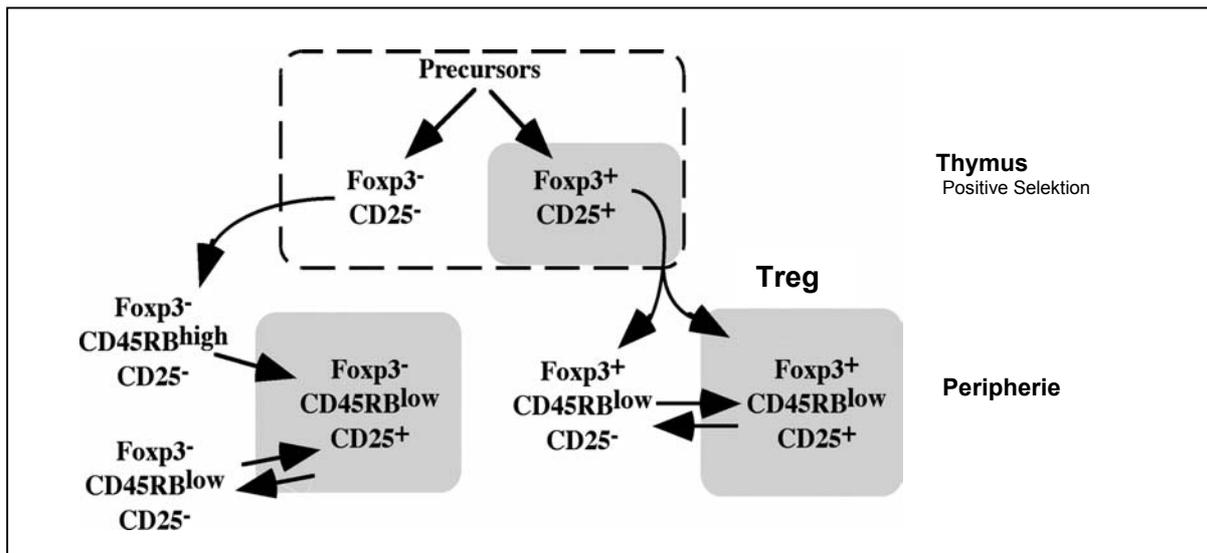


Abb. 30: Rolle von FOXP3 in der Entwicklung von regulatorischen T-Zellen. Aktivierende Liganden sind grau unterlegt (modifiziert nach [127])

Sowohl die ansteigende Expression von CD25, als auch von GITR, CTLA-4 und LAG-3 auf aktivierten nicht regulatorischen T-Zellen zeigen, dass die Expression dieser Moleküle nicht die Funktionalität der Treg-Zell-Population definiert [128].

$\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$ Populationen können auch geringe Mengen an FOXP3 exprimieren, jedoch ist der Level wesentlich geringer als in $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ T-Zellen [40-42]. Diesen Unterschied in der FOXP3 mRNA-Expression konnten wir auch zwischen deplitierten MNZ und CD25^+ Zellen beobachten. Regulatorische T-Zellen exprimieren auf mRNA-Ebene etwa 250 mal mehr FOXP3 als depletierte MNZ. Dieses Ergebnis zeigt, dass FOXP3 ein spezifischer Marker zur Identifizierung von regulatorischen T-Zellen ist. Im Gegensatz dazu werden CD25, CTLA-4, GITR und LAG-3 auch als Aktivierungsmarker von T-Zellen verwendet.

Ebenfalls kann $\text{TGF-}\beta$ die Expression von FOXP3 induzieren [120;129]. Die Arbeitsgruppe von S. Fu zeigte, dass $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$ Zellen unter Zusatz von $\text{TGF-}\beta$ nach 5 Tagen einen signifikant höheren FOXP3 Level aufweisen [129]. Es wurde beobachtet, dass $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ T-Zellen von Mäusen, welche $\text{TGF-}\beta_1$ überexprimieren zu einen Anstieg in der FoxP3 Expression führen. Dagegen reduziert ein gestörtes „ $\text{TGF-}\beta$ -signaling“ die FoxP3 Expression [130].

$\text{TGF-}\beta_1$ ist an vielen physiologischen Prozessen wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung Zellproliferation und Apoptose beteiligt. Abhängig vom Zelltyp, Entwicklungsstadium, Differenzierungsstadium und Zellzyklus-Position der Zielzelle weist $\text{TGF-}\beta$ unterschiedliche Aktivitäten auf. Im Darm wird $\text{TGF-}\beta$ vor allem von den ausdifferenzierten Epithelzellen in den Darmzotten synthetisiert [131]. Das multifunktionale Zytokin $\text{TGF-}\beta_1$ ist bekannt für die inhibitorische Wirkung auf die Proliferation von Lymphozyten, des weiteren beeinflusst

TGF- β_1 die Produktion und Sekretion von verschiedenen Zytokinen (wie z.B. IL-10, IL-2, IL-6) [132-134]. Dieses Zytokin unterdrückt die Aktivität zytotoxischer T-Zellen und inhibiert die Antikörperproduktion [135;136]. Eine bedeutende Rolle spielt TGF- β bei der Entwicklung von T-Vorläuferzellen in Richtung CD4⁺ oder CD8⁺. Auch die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu unterschiedlichen T-Helfer-Zell-Populationen (T_H1/T_H2) wird durch TGF- β gesteuert.

Aufgrund des breiten Aktivitätsspektrums spielt TGF- β eine zentrale Rolle bei der Regeneration, Immunreaktion und Tumorgenese.

Durch Aktivierung der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurde der Expressionslevel von TGF- β_1 reduziert, welcher durch den Einsatz des Inhibitors Phebestin wieder aufgehoben und in Bezug auf die unstimulierten Treg sogar deutlich gesteigert werden konnte. Die aktivierungsbedingte Abnahme der TGF- β_1 mRNA-Expression deckt sich mit der Tatsache, dass es sich um ein sehr stark immunsuppressives Zytokin handelt. Als Stimulationssystem wurde die Kombination aus PHA und PMA verwendet. PHA (Phytohämagglutinin) ist ein Lektin der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*), welches *in vitro* zu einer Aktivierung von Immunzellen, durch Nachahmung der Antigenstimulation, führt. Durch eine spezifische Bindung des Lektins an Kohlenhydratresten (N-Acetyl-Galaktosamin) von Oberflächenproteinen kommt es zu einer polyklonalen Stimulierung. PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) ist ein Phorbol-ester, das unter anderem als T-Zell-Aktivator verwendet wird. Stimulierte Zellen verändern ihre Morphologie indem sie unter anderem stark an Volumen zunehmen. Des weiteren exprimieren sie verschiedene Aktivierungsmarker, wie z.B. die T-Zellaktivierungsmarker IL-2 und IFN- γ . Um eine Kontamination mit aktivierten T-Lymphozyten auszuschließen, wurden unstimulierte regulatorische T-Zellen auf die Expression von IL-2 und IFN- γ auf mRNA-Ebene untersucht. Die Aktivierung der regulatorischen T-Zellen führt zur Expression von IL-2 und IFN- γ (T_H1-Zytokine) und somit zum Verlust der suppressiven Aktivität. T_H1-Zellen führen durch Freisetzung dieser Zytokine zur Stimulation von Makrophagen und verstärken deren mikrobizide Aktivität. Des weiteren werden durch die Ausscheidung von IFN- γ B-Zellen dazu veranlasst, IgG zu produzieren. Dagegen produzieren T_H2-Zellen IL-4, IL-6 und IL-10 und können die humorale Immunität induzieren. T_H2 vermittelte Suppressionen von T_H1-Antworten sind bei der Regulation von autoimmunen Erkrankungen beteiligt [36]. T_H2-Zellen und ihre Zytokine können die Entwicklung und die Effektor-Funktion von T_H1-Zellen inhibieren [137].

Der beobachtete Abfall in der TGF- β_1 und FOXP3 mRNA-Expression in regulatorischen T-Zellen, zusammen mit dem Anstieg in der IFN- γ und IL-2 mRNA-Expression in Reaktion auf PHA/PMA, deuten auf einen aktivierungsabhängigen Verlust der suppressiven Aktivität hin.

Da nach PHA/PMA-Aktivierung IL-2 mRNA nachgewiesen wurde, ist anzunehmen das IL-2 offenbar von den Effektorzellen produziert wird, welche durch Hyperaktivierung aus Treg entstanden sind.

Es wäre weiterhin zu untersuchen, wie sich die Stärke der Stimulation und der Zeitpunkt der Stimulation, d.h. in verschiedenen Stadien der Zelldifferenzierung, auf die mRNA-Expression und auf die suppressive Aktivität von regulatorischen T-Zellen auswirken. Die Optimierung der Treg-Aktivität könnte für den klinischen Einsatz von großem Nutzen sein.

Neben IL-2 und IFN- γ wurde T-bet, ein weiterer T_{H1}-Zell-Marker, in stimulierten regulatorischen T-Zellen nachgewiesen. T-bet (T-box expressed in T cells) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Transkription von IFN- γ kontrollieren kann [138]. Es wurde aber auch umgekehrt gezeigt, dass IFN- γ die Expression von T-bet kontrollieren kann [139]. Der Faktor ist gekennzeichnet durch eine konservierte T-box DNA-bindende Domäne und spielt eine entscheidende Rolle in der T-Helfer-Zelldifferenzierung. T-bet ist ein T_{H1} spezifischer Transkriptionsfaktor, welcher die T_{H2} Zelldifferenzierung inhibiert [138;140]. T-bet mRNA wurde nur in peripheren lymphoiden Geweben wie Milz, Lymphknoten und Leukozyten im Blut, jedoch nicht im Thymus und im Knochenmark detektiert [140]. Studien in T-bet defizienten Mäusen haben gezeigt, dass der Verlust von T-bet mit einer spontanen Entzündungsreaktion und Hyperreaktivität des Bronchialsystems assoziiert ist. Anhand von Asthma Patienten wurde eine Defizienz von T-bet bestätigt [141].

Auf mRNA-Ebene konnte T-bet in geringen Maßen in unstimulierten regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden. Durch Stimulation stieg die Expression deutlich an und wurde durch Applikation von Phebestin nochmals gesteigert.

Im Rahmen eigener mRNA-Untersuchungen von humanen regulatorischen T-Zellen ist die Expression von LAG-3 (lymphocyte activation gene, CD223) zu nennen (Daten nicht gezeigt), da LAG-3 mit großer Wahrscheinlichkeit selektiv an der Regulation von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen beteiligt ist [142]. In der Literatur wurde beschrieben das die LAG-3-Expression aktivierungsabhängig ist. Das Zell-Oberflächenmolekül LAG-3 bindet mit einer hohen Affinität an MHC Klasse II Moleküle [143]. LAG-3 besitzt eine negative Regulator-

Funktion [143-145] und kontrolliert die Funktion von Effektor-T-Zellen. Es gehört zur Immunoglobulin Super-Familie und wird selektiv in humanen aktivierten T- und NK-Zellen transkribiert [146;147]. Die Blockierung von LAG-3 auf Treg mit einem anti-LAG-3 Antikörper inhibiert die suppressiven Eigenschaften von regulatorischen T-Zellen [142]. Damit wurde gezeigt das LAG-3 nicht nur ein selektiver Marker für regulatorische Zellen ist sondern auch ein Molekül, welches für die maximale Aktivität der Treg, von Bedeutung ist. Jedoch ist LAG-3 nicht als selektiver Marker für Treg, wie es bei FOXP3 der Fall ist, einzusetzen, da LAG-3 in allen Zellen mit regulatorischer Aktivität (CD8⁺-Suppressor-T-Zellen, NK-Populationen) nachgewiesen werden kann.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Untersuchung von proinflammatorischen Zytokinen und spezifischen Transkriptionsfaktoren in regulatorischen T-Zellen eine entscheidende Rolle zukommt. Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten z.B. bei Colitis ulcerosa sind diese Ergebnisse von Bedeutung.

5.5 Charakterisierung regulatorischer T-Zellen auf Proteinebene

Um die Daten, welche auf mRNA-Ebene erhalten wurden, zu bestätigen, ist die Untersuchung der Expression von den beiden wichtigsten Mediatoren FOXP3 und TGF- β auf Proteinebene notwendig. TGF- β_1 ist ein 25 kDa Homodimer, das aus zwei, durch Disulfid-Brücken verbundenen, 12,5 kDa Untereinheiten besteht [148]. Mittels Westernblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass die reduzierte 12,5 kDa TGF- β Form in stimulierten regulatorischen T-Zellen, die mit Phebestin vorbehandelt wurden, eine über 4 mal größere Menge TGF- β exprimieren als unstimulierte regulatorische T-Zellen. Der Anstieg der nicht reduzierten 25 kDa großen TGF- β Form beträgt etwa 100 %.

Im Gegensatz zur Untersuchung auf der mRNA-Ebene, konnte 24 Stunden nach Stimulation mit PHA/PMA eine erhöhte FOXP3-Expression auf Proteinebene beobachtet werden. Somit scheinen posttranskriptionale Kontrollmechanismen wichtig für die FOXP3 Protein-Expression zu sein. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch mit anderen Stimulationssystemen [40;149]. Die Arbeitsgruppe J.D. Fontenot zeigte, dass 48 Stunden nach Aktivierung mit Platten-gebundenem anti-TCR- β und anti-CD28 in Anwesenheit von rekombinantem IL-2 die FOXP3 Protein Expression ansteigt [40]. Depletierte MNZ exprimieren kaum FOXP3 auf Proteinebene, weder im stimulierten noch im unstimuliertem

Zusand. Aufgrund dieser Daten wurde nochmals bestätigt, dass FOXP3 ein zuverlässiger Marker für regulatorische T-Zellen ist.

Der Zusatz von Phebestin zur Zellkultur steigert nochmals die FOXP3-Proteinexpression von regulatorischen T-Zellen im Vergleich mit PHA/PMA stimulierten Zellen.

Durchflußzytometrie-Untersuchungen wurden zusätzlich zu mRNA und Westernblotanalysen durchgeführt, um mögliche Veränderungen der zellulären Oberflächenstrukturen erkennen zu können und um Hinweise zur Wirkungsweise der Treg zu erhalten. Auch hier lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung von TGF- β . Durch Zugabe des Inhibitors Phebestin zur Zellkultur wurde nach 24 Stunden nur eine Steigerung der Oberflächenexpression um 15 % im Vergleich zu unstimulierten regulatorischen T-Zellen gemessen. Im Vergleich zur TGF- β mRNA-Expression ist der Anstieg nach Phebestin Gabe erstaunlich niedrig. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Induktion der TGF- β Oberflächenexpression sehr langsam erfolgt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass eine Sekretion von TGF- β in das Zellkulturmedium erfolgte. Dies konnte mittels TGF- β -ELISA nachgewiesen werden. Eine Aussage über die TGF- β Expression nach einer längeren Inkubation der Zellen (72 Stunden) war nicht möglich, da die Kultivierung der Zellen über drei Tage zum Absterben der Zellen führte.

5.6 Die Rolle der regulatorischen T-Zellen in der DSS-induzierten Colitis

Tiermodelle, vor allem Mausmodelle spielen bei der Erforschung der CED eine bedeutende Rolle. Diese Modelle zeigen einige klinische und histologische Analogien zur menschlichen CED und werden insbesondere für immunologische, genetische und umweltbedingte Experimente eingesetzt und tragen somit zur Gewinnung von neuen Erkenntnissen erheblich bei. Tiermodelle [70;73-82;150;151], sowie Befunde am Menschen [152;153] zeigen, dass das Immunsystem entscheidend an der Darmentzündung beteiligt ist. Eine zu schwache Aktivierung des Immunsystems kann zur Persistenz von Krankheitserregern oder zur Ausbreitung von Tumorzellen führen. Dagegen kann eine zu starke Aktivierung in Autoimmunerkrankungen resultieren.

Wie bereits erwähnt ist ein Gleichgewicht von T_H1- und T_H2-Zytokinen für die Kontrolle der chronischen intestinalen Inflammation notwendig. Da regulatorische T-Zellen anti-inflammatorische Zytokine (TGF- β , IL-10) bilden, sind Treg entscheidend an der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes beteiligt.

Auf mRNA-Ebene und Proteinebene könnte gezeigt werden, dass aktivierungsabhängige Veränderungen durch Einsatz des mAAP-Inhibitors Phebestin in regulatorischen T-Zellen aufgehoben oder deutlich verringert werden können. Somit war der nächste Schritt diese Ergebnisse im *in vivo* Modell zu reproduzieren. Es stellte sich die Frage ob a) Phebestin, b) regulatorische T-Zellen aus gesunden Mäusen isoliert und c) die mit Phebestin *ex vivo* inkubierten regulatorischen T-Zellen eine Verbesserung für den Krankheitsscore in einem Colitis-Maus-Modell darstellen.

Es gibt jedoch eine Reihe von verschiedenen Modellen für die akute Colitis, welche alle Vor- und Nachteile besitzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das DSS-induzierte Colitis Maus-Modell für die Untersuchung der regulatorischen T-Zellen und des Aminopeptidase-Inhibitors Phebestin eingesetzt. Dieses Modell zeigt eine sehr große Ähnlichkeit zu Colitis ulcerosa Patienten, sowohl systematisch als auch histologisch [70;154]. Aufgrund einer guten Reproduzierbarkeit kann das Modell zur Bewertung der Wirkung von neuen Therapeutika eingesetzt werden [155].

Um sicherzustellen dass die regulatorischen T-Zellen den Darm erreichen, wurden in einem Vorversuch mit dem CellTracker Green CMFDA die Treg markiert und dem Tier injiziert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden die Darmschnitte ausgewertet. Mit dieser Methode konnten wir nachweisen, dass die regulatorischen T-Zellen ihr Ziel, den Bereich der Inflammation, erreicht haben. Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, den Anteil der Zellen zu bestimmen, die den Darm erreichen, sowie andere Orte der Treg-Akkumulation (z.B. Milz, Leber) zu quantifizieren.

Die DSS-induzierte Colitis ist durch eine Konzentrations- und Zeit-abhängige Toxizität von DSS gegen intestinale Epithelzellen gekennzeichnet [156]. Das gesunde Darmepithel ist relativ undurchdringlich für Bakterien und bakterielle Produkte. Eine Verletzung der Epithelzellen durch DSS führt jedoch zu einer Permeabilitätserhöhung, sodass durch die Einwanderung von Bakterien der Entzündungsprozess ausgelöst werden kann. Dieser Vorgang der unkontrollierten Immunantwort ist im wesentlichen als Grund für die Auslösung der akuten DSS-induzierten Colitis zu nennen.

Die intestinale mikrobielle Flora spielt eine wichtige Rolle bei der Initiation und beim Verlauf von IBD im Menschen [74;182]. Es entwickeln fast alle Tiermodelle für CED in keimfreier Umgebung keine Colitis. In keimfrei gehaltenen Mäusen kann aber eine intestinale Inflammation durch DSS induziert werden [183].

Das DSS-Colitis-Modell zeigt die meisten typischen Krankheitsanzeichen, welche in humanen Colitis-Patienten beobachtet wurden. Dazu zählen Diarrhoe, Blut im Stuhl, Darmblutungen, Analfisteln und Gewichtsverlust. Außerdem korreliert das histologische Bild der DSS-Maus mit dem endoskopischen Bild der Colitis-Patienten.

In entzündeten Darmabschnitten von Patienten mit CED finden sich vermehrt T-Zellen, die bestimmte Botenstoffe (Interleukine IL-12 und IL-18) im Übermaß produzieren. Diesen Immunzellen und deren Botenstoffe wird eine zentrale Rolle bei der Krankheitsentstehung zugeschrieben. Die gesteigerte T-Zellaktivierung bei CED geht vermutlich mit einer spezifischen antigenspezifischen Stimulation von CD4⁺ T-Zellen einher.

Hauptparameter als Maß für den Schweregrad der Colitis ulcerosa war der disease activity index, in dem die Gewichtsveränderungen, Stuhlkonsistenz und die rektale Blutung zusammengefasst wurden. Die Beurteilung des Schweregrades der Darmentzündung erfolgte mit Hilfe eines semiquantitativen Score (modifiziert nach [70]). Ein weiterer Parameter war die histologische Beurteilung von H.E.-gefärbten Schnittpräparaten des Kolons. Die Beobachtungen wurden in einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten semiquantitativen histologischen Scores zusammengefasst (modifiziert nach [157]).

Im Gegensatz zu anderen Arbeitsgruppen, haben wir DSS über den gesamten Versuchszeitraum appliziert. Das entspricht eher der Situation des Patienten. Ziel der Arbeit ist nicht die Prophylaxe, sondern die Heilung der Colitis-Erkrankung.

5.7 Protektive Wirkung von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in einem *in vivo* Maus Modell für Colitis

Eine einmalige Behandlung mit a) Phebestin, b) regulatorische T-Zellen aus gesunden Mäusen isoliert und c) die mit Phebestin *ex vivo* inkubierten regulatorischen T-Zellen bei Mäusen mit akuter DSS-induzierter Colitis wurde durchgeführt, um zu untersuchen, wie sich die injizierten Stoffe auf den Krankheitsverlauf auswirken. Als Kontrollgruppe wurden DSS-Colitis-Mäuse verwendet, welche einmal Hanks' Salt Solution intravenös in die Schwanzvene injiziert bekamen. Die Kontrollgruppe zeigte bereits am zweiten Tag nach der Behandlung einen deutlich höheren disease activity index. Von den drei verschiedenen Behandlungen zeigte sich die Gruppe mit den Phebestin vorbehandelten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen am effektivsten, der disease activity index ist am zweiten Tag nach der Behandlung signifikant und ist bis zum Ende des Versuches (vier Tage nach der Injektion/Tag 7) am niedrigsten. Somit ist der stark suppressive Effekt bis zum Tag 5 (zwei Tage nach der Injektion) am

stärksten sichtbar. Die alleinige Injektion von Phebestin war ebenfalls sehr effektiv und lag am Tag 7 nur knapp über der kombinierten Behandlung. Dies zeigt, dass Phebestin potentiell in die Entzündungsreaktion eingreift. Eine Möglichkeit ist, dass Treg, welche das Tier selbst besitzt, eine Stärkung der suppressiven Aktivität durch den mAAP-Inhibitor erhalten. Ob diese Zellen bereits am Ort der Entzündung sind oder erst nach Kontakt mit Phebestin dort hingelangen ist unklar. Um Aussagen über die suppressive Aktivität der regulatorischen T-Zellen der erkrankten Tiere machen zu können, wäre ein Vergleich zwischen Treg aus DSS-Mäusen und gesunden Mäusen hilfreich. Die Injektion von Treg, welche zuvor eine Erhöhung der suppressiven Aktivität durch Inkubation mit dem mAAP-Inhibitor Phebestin erhielten, zeigte jedoch die größte Wirkung auf den Verlauf der Erkrankung. Überraschenderweise führte die einzelne Injektion von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen nicht zu einem deutlich niedrigerem DAI und damit verbunden zu keinem milderem Krankheitsverlauf. Der disease activity index lag nur 0,83 Punkte unter dem Score der Kontrollgruppe. Ein Grund dafür könnte sein, dass die injizierte Zellzahl von 1×10^6 $CD4^+CD25^+$ T-Zellen pro Tier nicht ausreichte. Es ist anzunehmen, dass nicht alle injizierten Treg den Ort der Entzündung erreichen. Weiterhin ist es möglich, dass die injizierten regulatorische T-Zellen auf dem Weg zum Entzündungsherd einen Teil ihrer suppressiven Eigenschaften verlieren. In einem EAE-Maus-Modell wurden 2×10^6 $CD4^+CD25^+$ T-Zellen pro Tier transferiert [158]. Jedoch ist diese Anzahl an regulatorischen T-Zellen mit einer großen Zahl an gesunden Mäusen verbunden und somit schwer zu realisieren. Die Arbeitsgruppe von Huehn zeigte, dass es unter den $CD4^+CD25^+$ T-Zellen eine außerordentlich effektive Subset gibt. Vor allem $\alpha_E\beta_7$ -positive (CD103), L-Selektin-negative $CD4^+CD25^+$ Suppressor-T-Zellen sind bei der Unterdrückung von lokalen inflammatorischen Reaktionen effektiv beteiligt im Vergleich zu $\alpha_E\beta_7$ -negativen, L-Selektin-positiven $CD4^+CD25^+$ Suppressor-T-Zellen [159]. In einem anderen Colitis-Modell ($CD4^+CD45RB^{high}$) führte die Injektion von $CD25^+$ T-Zellen zu einer Abnahme im Colitis-Score und zu einer Gewichtszunahme der Tiere [160].

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte in der Versuchsreihe 1a und 1b jeweils nur eine einmalige Injektion der Treg um erstmals die Wirkung von Treg und Phebestin auf erkrankte Tiere zu überprüfen („proof of principle“). Weitere Versuche an denen die isolierten regulatorischen Zellen an zwei oder mehreren Tagen injiziert werden sind notwendig um so eventuell deutlichere Effekte zu erzielen. Damit verbunden ist jedoch eine wesentlich größere Anzahl von Spendertieren um die entsprechende Zahl regulatorischer T-Zellen zu isolieren. Des

weiteren könnte man die Inkubationszeit von Treg mit Phebestin, bevor diese Kombination in die DSS-Maus injiziert wird, verlängern.

Ein Bestandteil des disease activity index ist die Gewichtsveränderung. Die Gewichtsveränderungen der einzelnen Gruppen ist in Übereinstimmung mit dem DAI zu sehen. Bei den drei behandelten Gruppen ist am ersten Tag nach der Injektion eine leichte Gewichtszunahme zu erkennen, dagegen zeigt die Kontrollgruppe bereits eine leichte Gewichtsabnahme.

Nach Beendigung des Versuches wurde als ein weiteres Maß für die Entzündung die Colonlänge bestimmt. Je kürzer der Darm, desto größer ist die Entzündung. Die Kontrollgruppe weist am vierten und siebenten Tag eine verkürzte Colonlänge im Vergleich zu den behandelten Gruppen auf.

Zur weiteren Analyse der behandelten Gruppen wurde ein histologischer Score aufgestellt, auf den ich später noch näher eingehen möchte.

Da die Separation von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen aus gesunden Mäusen sehr aufwendig ist und Phebestin am Tag 7 nur 0,34 Punkte über der kombinierten Behandlung lag, wurde in einem weiteren Versuch Phebestin über einen längeren Zeitraum und in unterschiedlichen Konzentrationen injiziert. Ab dem zweiten Tag erfolgte die Injektion bis zum sechsten Tag entweder einmal täglich mit je 50 μg (Gesamtdosis 250 μg) oder zweimal täglich mit je 50 μg (Gesamtdosis 500 μg). Die Kontrollgruppe erhielt ab dem zweiten Tag zweimal täglich PBS. Für weitere Versuche ist die Optimierung der Dosierung von Phebestin, sowie die Gabe von Phebestin zu unterschiedlichen Zeitpunkten notwendig.

Die *in vitro* Aktivierung der regulatorischen T-Zellen mit PHA/PMA, ist mit der induzierten Erkrankung in der Maus zu vergleichen. Die Kombination aus PHA/PMA mit Phebestin im Zellmodell stellt die Behandlung der Colitis Mäuse mit Phebestin *in vivo* dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Phebestin vorbehandelten regulatorischen T-Zellen in der DSS-induzierten Colitis zu einer signifikanten Verbesserung der Entzündung führte. Dies äußert sich durch einen niedrigeren disease activity index, einen geringeren Gewichtsverlust, einem längeren Colon und einem niedrigeren histologischen Score. Dieses Resultat zeigt die Möglichkeit auf, dass Treg die Fähigkeit besitzen die

Effektor-T-Zell-Antwort nicht nur im Lymphknoten, sondern auch in inflammatorischen Geweben zu kontrollieren.

Verschiedene Hypothesen um zu erklären, wie die Colitis die Thymus Funktion und vor allem die Treg Entwicklung reguliert, wurden aufgestellt. Eine Möglichkeit ist das die Effektor T-Zellen bei der Colitis zurück in den Thymus gelangen und dort das Epithelium angreifen, welches normalerweise die Treg selektiert. Eine andere Möglichkeit ist, dass die entzündete Darm-Mukosa Zytokine freisetzt, welche die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen im Thymus verhindern [161]. Es ist noch unklar wie regulatorische T-Zellen effektiv die inflammatorischen Darmerkrankungen regulieren können, aber es wird vermutet, dass durch „Homing“ und bevorzugtes Einlagern von Treg in das betroffene mukosale Gewebe eine Regulation der Erkrankung stattfindet [162].

5.8 mRNA Expression im Darm und in den Splenozyten der DSS-Mäuse

Die Untersuchungen der mRNA-Expression im Colon ergaben erwartungsgemäß, dass die Zytokine TGF- β und IL-10 und auch die Transkriptionsfaktoren FoxP3 und T-bet in der Kontrollgruppe der DSS-Mäuse deutlich weniger exprimiert wurden. Die Daten auf der mRNA-Ebene bestätigen die erhaltenden klinischen Daten (disease activity index, Histoscore).

CD4⁺CD25⁺ T-Zellen produzieren *in vivo* IL-10 und es wurde bereits nachgewiesen, dass z.B. Colitis durch CD4⁺CD25⁺ T-Zellen und ihrer IL-10 Sekretion unterdrückt werden kann [163;164], dagegen wird die autoimmune Gastritis unabhängig von IL-10 supprimiert [49;164]. IL-10 scheint eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Colitis zu spielen. IL-10 defiziente Mäuse entwickeln eine Colitis [75] und die Gabe von rekombinantem IL-10 inhibiert die Entwicklung der Colitis in SCID-Mäusen [151]. Auch im DSS-Modell wurde die therapeutische Wirkung von IL-10 bereits gezeigt [165], doch erste Daten am Menschen zeigten eine nur mittelmäßige Wirksamkeit [166;167]. Als Grund wurde die Produktion des entzündungsfördernden Zytokins IFN- γ bei IL-10 Gabe festgestellt [168]. Neben IL-10 ist TGF- β ein wichtiges Zytokin bei der Regulation einer pathogenen inflammatorischen Antwort. TGF- β defiziente Mäuse entwickeln inflammatorische Läsionen in verschiedenen Organen, unter anderem dem Gastrointestinaltrakt [169]. Hahm und Mitarbeiter stellten die Hypothese auf, dass der spezifische Verlust des TGF- β „Signaling“ im Epithel des Darms zu

einem Anstieg der Anfälligkeit für IBD mit verantwortlich ist [170]. In einem Colitis-Mausmodell (T_H1 -Zell vermittelt) konnte die entzündliche Erkrankung durch den Zelltransfer von $CD45RB^{low} CD4^+$ T-Zellen rückgängig gemacht werden. Die Wirkung des Zelltransfer wird durch die Gabe eines anti-TGF- β Antikörpers aufgehoben [50].

IL-10^{-/-} Mäuse zeigen eine gestörte Immunpathologie im Darm, dagegen entwickeln TGF- β_1 ^{-/-} Mäuse multiple Organerkrankungen [169]. Diese Befunde zeigten, dass IL-10 nicht für die Produktion von TGF- β_1 benötigt wird [171].

T-bet Expression wird in der Literatur meist nur im Zusammenhang mit Morbus Crohn diskutiert, da es sich um ein T_H1 Transkriptionsfaktor handelt. T-bet ist in der Lage T_H2 -Zellen in T_H1 -Zellen „umzuwandeln“ [138]. Neurath und Mitarbeiter haben gezeigt, dass die Expression von T-bet bei Morbus Crohn ansteigt [101]. Einen T-bet Vergleich zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten zeigte die Arbeitsgruppe von Matsuoka. Die T-bet Expression von $CD4^+$ Lamina propria mononuclearen Zellen (LPMZ) ist bei Morbus Crohn Patienten deutlich erhöht im Vergleich zu Colitis ulcerosa Patienten [172]. Da T-bet auch im Zusammenhang mit TGF- β diskutiert wird [101;173], wurde die T-bet Expression im Darm und in den Splenozyten der DSS-Mäuse nachgewiesen. Es konnte jedoch nicht bestätigt werden, dass die TGF- β Expression die T-bet Expression unterdrückt, da sowohl im Darm als auch in den Splenozyten, in den mit Phebestin und regulatorischen T-Zellen behandelten DSS-Mäusen, eine signifikant höhere T-bet Expression nachgewiesen wurde.

Die Transgene Überexpression von FoxP3 führt zu einer reduzierten Anzahl an peripheren T-Zellen. Die restlichen T-Zellen zeigen eine beeinträchtigte Antwort auf die T-Zell-Rezeptor-Bindung [174]. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Überexpression von FoxP3 zu einem Anstieg an $CD4^+CD25^+$ T-Zellen und damit Verbunden zur Erwerbung der suppressiven Eigenschaften führt [41]. Sowohl $CD4^+CD25^-$ als auch $CD4^-CD8^+$ T-Zellen aus FoxP3-überexprimierenden Mäusen zeigen eine suppressive Aktivität, was beweist, dass die Expression von FoxP3 mit der suppressiven Funktion verbunden ist [41].

Somit wurde bestätigt, dass TGF- β_1 , IL-10, FoxP3 und T-bet an der inflammatorischen Darmentzündung beteiligt sind.

5.9 Histologische Untersuchung der Darmschnitte von den DSS-Mäusen

Die charakteristischen Zeichen einer akuten intestinalen Entzündung sind z.B. Krypten- und Becherzellverluste sowie neutrophile Granulozyten-Infiltrate. Durch DSS-Gabe im Trinkwasser von BALB/c Mäusen werden auch diese Effekte in der Mucosa der Maus ausgelöst.

Bei einem akuten Entzündungsprozess sind polymorphkernige neutrophile Granulozyten dabei der vorherrschende Zelltyp. Diese Zellen sind verantwortlich für die Aufnahme und Zerstörung von extrazellulären Mikroorganismen, vor allem Bakterien und auch für die Aktivierung anderer Zellen des Immunsystems [175].

Zur Ermittlung des Schweregrades der Darmentzündung wurde im Rahmen dieser Arbeit ein semiquantitativer Score aufgestellt. Der Score wurde in Anlehnung an die Arbeiten von W. Hans [157] entwickelt. Für die histologische Auswertung wurden folgende Faktoren berücksichtigt. 1. Architekturstörungen: Mit zunehmender Entzündung des Gewebes verliert sich der typische Schichtenbau der Darmwand. Krypten zeigen ungleichmäßige Durchmesser und sind teilweise verlängert. 2. Granulome: Darunter versteht man eine Gewebsneubildung bzw. eine Wucherung durch Gewebsneubildung als Folge einer Entzündung. 3. Erosion: Intramucosaler Substanzdefekt mit granulozytärer Abgrenzung und Fibrin an der Oberfläche. 4. Infiltrate: In der Lamina propria finden sich lymphoplasmazytäre Infiltrate mit einem überproportional erhöhtem Anteil an Granulozyten.

Histologische Beobachtungen der Hämatoxylin/Eosin gefärbten Darmpräparate zeigen inflammatorische Zell-Infiltrate, polymorphkernige Leukozyten und multiple Erosionsläsionen verstärkt in der Kontrollgruppe am Tag 4 und 5. Daraus resultiert ein hoher histologischer Score von 2,87 Punkten am Tag 4 und 2,93 Punkten am Tag 5. Auch die Phebestin behandelten Tiere zeigen vermehrt diese histologische Charakteristik am Tag 5 und dies führt ebenfalls zu einem erhöhten histologischen Score. Signifikant niedriger ist der histologische Score am Tag 4 bei der Gruppe mit Phebestin vorbehandelten regulatorischen T-Zellen (1,67 Punkte) und überraschender Weise am Tag 5 bei der Gruppe, welche nur regulatorische T-Zellen injiziert bekamen (1,87 Punkte).

Dieses Ergebnis zeigt, dass bereits eine einmalige Injektion von regulatorischen bzw. mit Phebestin vorbehandelten regulatorischen T-Zellen die intestinale Pathologie der DSS-Colitis Mäuse verbessert.

Die neutrophilen Granulozyten spielen in der akuten Phase der Colitis eine wichtige Rolle. Das zeigt sich darin, dass sich auch in SCID-Mäusen, denen reife T- und B-Zellen fehlen, eine DSS-induzierte Colitis entwickelt [176;177]. Andere Arbeiten zeigen jedoch das T-Zell-Aktivierung und Zytokine (TNF- α , IL-1) in der Pathogenese der DSS-induzierten akuten Colitis eine wichtige Rolle spielen [151;154;178;179].

5.10 Klinische Bedeutung der regulatorischen T-Zellen

Eine Voraussetzung für die Entwicklung neuer Pharmaka ist die Identifizierung der am Entzündungsgeschehen beteiligten Zytokine. Jedoch ist für die Entstehung einer pathologischen Entzündungsreaktion nicht allein die Anwesenheit suppressiver und proinflammatorischer Faktoren entscheidend, sondern vor allem die Relation beider Faktoren zueinander. Somit ist es von großer Bedeutung, dass Netzwerk intrazellulärer Signalmechanismen zu entschlüsseln.

Trotz der noch vielen offenen Fragen ist bereits klar, dass regulatorische T-Zellen ein enormes Potential für zukünftige Therapien bei Autoimmunerkrankungen wie z.B. Typ I-Diabetes, Multiplen Sklerose, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa besitzen. Auch bei Transplantationen, bei Infektionserkrankungen (wie z.B. HIV) und in der Tumorummunologie wäre der Einsatz von regulatorischen T-Zellen denkbar.

Erste Versuche haben gezeigt, dass regulatorische T-Zellen für therapeutische Einsätze bei Autoimmunerkrankungen und bei der Prävention von Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen eine große Bedeutung besitzen. Eine Möglichkeit der Anwendung könnte eine Zelltherapie sein, bei der Patienten mit *in vitro* kultivierten regulatorischen Zellen behandelt werden und somit die Autoimmunerkrankung unter Kontrolle bringen [44;184]. Jedoch ist es bis heute noch nicht gelungen, Langzeit-Kulturen zu etablieren in denen regulatorische T-Zellen ihre suppressiven Eigenschaften behalten. Ebenfalls wurde eine Anwendung diskutiert, bei der Treg selbst Zytokine wie das IL-10 oder TGF- β_1 produzieren. Es gibt bereits erste Studien zur Induktion von regulatorischen T-Zellen am Menschen, in der Multiple-Sklerose-Patienten oral mit dem MS-Autoantigen MBS (Myelin basic protein) behandelt wurden. Daraufhin wurden MBP spezifische TGF- β freisetzende T_{H3} Zellen im Blut der Patienten gefunden [185]. Spekulationen gibt es auch über immunmodulatorische Medikamente, welche zur Vergrößerung des patienteneigenen Pools an regulatorischen T-Zellen führen [44]. Die Entwicklung neuer Medikamente welche die Eigenschaft besitzen, in den betroffenen Patienten regulatorische T-Zellen zu vermehren und somit das nötige

Gleichgewicht zwischen den krankheitsinduzierenden autoreaktiven T-Zellen und den regulatorischen T-Zellen wiederherstellen, könnte eine effektive und gezielte Behandlungsmöglichkeit von Autoimmunerkrankungen darstellen. Die Interaktion zwischen T-Zelle und APC ist abhängig von der Antigenpräsentation via MHC und der Kostimulation (CD28/B7, CD80, CD86). Zwei Studien mit humanem Biopsiematerial deuten darauf hin, dass der B7 kostimulatorische Weg bei inflammatorischen Darmentzündungen notwendig ist [180;181].

Peptidase-Inhibitoren können durch die Hemmung von Enzymaktivitäten in die Regulation und Steuerung von Krankheiten eingreifen. Phebestin und auch andere Peptidase-Inhibitoren (wie z.B. Bestatin, Actinonin, RB3014, I49) könnten so ein immunmodulatorisches Medikament darstellen. Vor allem bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen und entzündlichen Prozessen sind Peptidase-Inhibitoren von großer Bedeutung. Es ist jedoch für den klinischen Einsatz notwendig die Entstehung, den immunregulatorischen Wirkmechanismus und die Beeinflussbarkeit regulatorischer T-Zellen weiter zu charakterisieren. Experimente zur Toleranzinduktion gegenüber dem Spenderorgan durch immunmodulatorische Effekte in Mausmodellen bei Haut- [186], Herz- und Knochenmarktransplantationen verliefen bereits positiv [187-189].

Auch Versuche mit regulatorischen T-Zellen in Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen wie beim Lupus erythematodes (LE), Colitis ulcerosa und Morbus Crohn zeigten, dass die Krankheitsprozesse abgemildert oder teilweise sogar aufgehalten werden [171;190].

Mit den Ergebnissen zur immunsuppressiven Wirkung des Aminopeptidase-Inhibitors Phebestin bei der Colitis, wurde die Grundlage für ein neuartiges Konzept zur Behandlung von entzündlichen- und Autoimmunerkrankungen geschaffen.

6. Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen (Treg) nehmen aufgrund ihrer vielseitigen Funktionen eine zentrale Rolle innerhalb des Immunsystems ein.

Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss des Amino-peptidase-Inhibitors Phebestin auf regulatorischen T-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Amino-peptidase-Inhibitor Phebestin die Fähigkeit besitzt, die Gen-Expression und die suppressive Aktivität von regulatorischen T-Zellen *in vitro* zu kontrollieren und die Proliferation von Effektor-Zellen zu modulieren. Als wichtiges Zytokin ist in diesem Zusammenhang TGF- β zu nennen. Die TGF- β mRNA-Expression wird durch Phebestin deutlich gesteigert. Großes Interesse galt auch dem Transkriptionsfaktor FOXP3, welcher ebenfalls ein wichtiger Vermittler der suppressiven Aktivität ist. FOXP3 ist essential für die Entwicklung der regulatorischen T-Zellen und stellt zudem einen zuverlässigen Marker dieser Zellen dar. Ähnlich wie bei TGF- β führt eine Stimulation von regulatorischen T-Zellen zu einer verminderten FOXP3-Expression. Des Weiteren konnte in einem *in vivo* Modell eine immunsuppressive Wirkung beobachtet werden. Als Krankheitsmodell für die Untersuchung der regulatorischen T-Zellen und des Amino-peptidase-Inhibitor Phebestin wurde das DSS-induzierte Colitis Maus-Modell gewählt. Zur Induktion der Colitis ulcerosa wurde den Tieren 3 % Dextran-sulfat im Trinkwasser über einen Zeitraum von sieben Tagen oral verabreicht. Um die Wirksamkeit von Phebestin, regulatorischen T-Zellen und die Kombination aus Phebestin und regulatorischen T-Zellen im DSS-Modell zu bestimmen, wurde der disease activity index (DAI), der histologische Score und die Colonlänge mit der Kontrollgruppe (Hanks) verglichen. Der disease activity index ist bei Phebestin vorbehandelten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen am niedrigsten.

Auch die TGF- β , IL-10, FoxP3 und die T-bet mRNA-Expression im Colon und in den Splenozyten der verschiedenen Behandlungsgruppen wurde untersucht. In Übereinstimmung mit den klinischen Daten und den Daten aus dem *in vitro* Modell, ist die TGF- β , IL-10, FoxP3 und die T-bet Expression in der Gruppe, welche mit Phebestin vorbehandelte Treg erhielten, am höchsten. Das lässt darauf schließen, dass in der Tat eine Stärkung der suppressiven Aktivität von Treg durch mAAP-Inhibitoren erreicht werden kann, und dass die Aktivität der applizierten Treg am Ort der Entzündung zum Tragen kommt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Gabe des Alanyl-Amino-peptidase-Inhibitors, einzeln und als kombinierte Zelltherapie mit immunmodulierten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen potentiell für die pharmakologische Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und inflammatorischen Erkrankungen wie z.B. Colitis ulcerosa von Bedeutung ist.

7. Literaturverzeichnis

1. Schemberg D. and M. Salzmann. 1990. In: Enzym Handbook, Class 4: Hydrolases. Heidelberg: Springer Verlag, Berlin.
2. Hooper, N.M., E.H. Karran, and A.J. Turner. 1997. Membrane protein secretases. *Biochem. J.* 321: 265-279.
3. Olsen, J., K. Kokholm, O. Noren, and H. Sjoström. 1997. Structure and expression of aminopeptidase N. *Adv. Exp. Med. Biol.* 421:47-57.: 47-57.
4. Pfeleiderer, G. and P.G. Celliers. 1963. [Isolation of an Aminopeptidase from kidney particles.]. *Biochem. Z.* 339:186-9.: 186-189.
5. Olsen, J., G.M. Cowell, E. Königshofer, E.M. Danielsen, J. Møller, L. Laustsen, O.C. Hansen, K.G. Welinder, J. Engberg and W. Hunziker. 1988. Complete amino acid sequence of human intestinal aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA. *FEBS Lett.* 238: 307-314.
6. Look, A.T., R.A. Ashmun, L.H. Shapiro, and S.C. Peiper. 1989. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J. Clin. Invest* 83: 1299-1307.
7. Watt, V.M. and H.F. Willard. 1990. The human aminopeptidase N gene: isolation, chromosome localization, and DNA polymorphism analysis. *Hum. Genet.* 85: 651-654.
8. Lerche, C., L.K. Vogel, L.H. Shapiro, O. Noren, and H. Sjoström. 1996. Human aminopeptidase N is encoded by 20 exons. *Mamm. Genome* 7: 712-713.
9. Shapiro, L.H., R.A. Ashmun, W.M. Roberts, and A.T. Look. 1991. Separate promoters control transcription of the human aminopeptidase N gene in myeloid and intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 266: 11999-12007.
10. Olsen, J., L. Laustsen, U. Karnström, H. Sjoström, and O. Noren. 1991. Tissue-specific interactions between nuclear proteins and the aminopeptidase N promoter. *J. Biol. Chem.* 266: 18089-18096.
11. Olsen, J., K. Kokholm, J.T. Troelsen, and L. Laustsen. 1997. An enhancer with cell-type dependent activity is located between the myeloid and epithelial aminopeptidase N (CD 13) promoters. *Biochem. J.* 322: 899-908.
12. Gillis, L.D., D.S. Pendley, and J.D. Funkhouser. 1998. The major APN transcript of the alveolar type II epithelial cell originates from a unique upstream promoter region. *Biochim. Biophys. Acta* 20;1399: 126-140.
13. Lendeckel, U., M. Arndt, K. Frank, T. Wex, and S. Ansorge. 1999. Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (review). *Int. J. Mol. Med.* 4: 17-27.
14. Olsen, J., K. Kokholm, O. Noren, and H. Sjoström. 1997. Structure and expression of aminopeptidase N. *Adv. Exp. Med. Biol.* 421:47-57.: 47-57.

15. Wex,T., F.Buhling, M.Arndt, K.Frank, S.Ansorge, and U.Lendeckel. 1997. The activation-dependent induction of APN-(CD13) in T-cells is controlled at different levels of gene expression. *FEBS Lett.* 412: 53-56.
16. Ashmun,R.A. and A.T.Look. 1990. Metalloprotease activity of CD13/aminopeptidase N on the surface of human myeloid cells. *Blood* 75: 462-469.
17. Lendeckel,U., T.Wex, D.Reinhold, M.Arndt, A.Ittenson, K.Frank, and S.Ansorge. 1997. Activation-dependent induction of T cell alanyl aminopeptidase and its possible involvement in T cell growth. *Adv. Exp. Med. Biol.* 421:59-66.: 59-66.
18. Delmas,B., J.Gelfi, R.L'Haridon, L.K.Vogel, H.Sjostrom, O.Noren, and H.Laude. 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 357: 417-420.
19. Pasqualini,R., E.Koivunen, R.Kain, J.Lahdenranta, M.Sakamoto, A.Stryhn, R.A.Ashmun, L.H.Shapiro, W.Arap, and E.Ruoslahti. 2000. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 60: 722-727.
20. Tatsumi,N., Y.Sannomiya, A.Sasaki, T.Im, K.Ota, H.Oohira, H.Nakao, and Y.Yasui. 1991. Effects of ubenimex, a biological response modifier, on myelodysplastic syndrome and chronic leukemia. *Biomed. Pharmacother.* 45: 95-103.
21. Ota,K. and Y.Uzuka. 1992. Clinical trials of bestatin for leukemia and solid tumors. *Biotherapy* 4: 205-214.
22. Kunz,D., F.Buhling, H.J.Hutter, T.Aoyagi, and S.Ansorge. 1993. Aminopeptidase N (CD13, EC 3.3.4.11.2) occurs on the surface of resting and concanavalin A-stimulated lymphocytes. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 374: 291-296.
23. Bukowska,A., J.Tadje, M.Arndt, C.Wolke, T.Kahne, J.Bartsch, J.Faust, K.Neubert, Y.Hashimoto, and U.Lendeckel. 2003. Transcriptional regulation of cytosol and membrane alanyl-aminopeptidase in human T cell subsets. *Biol. Chem.* 384: 657-665.
24. Riemann,D., A.Kehlen, and J.Langner. 1995. Stimulation of the expression and the enzyme activity of aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 on human renal cell carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by T cell-derived cytokines, such as IL-4 and IL-13. *Clin. Exp. Immunol.* 100: 277-283.
25. Tangada,S.D., R.D.Peterson, and J.D.Funkhouser. 1995. Regulation of expression of aminopeptidase N in fetal rat lung by dexamethasone and epidermal growth factor. *Biochim. Biophys. Acta* 1268: 191-199.
26. Hui,K.S., M.Hui, A.Lajtha, M.Saito, and M.Saito. 1990. Cellular localization of puromycin-sensitive aminopeptidase isozymes. *Neurochem. Res.* 15: 1147-1151.
27. Hersh,L.B. and J.F.McKelvy. 1981. An aminopeptidase from bovine brain which catalyzes the hydrolysis of enkephalin. *J. Neurochem.* 36: 171-178.
28. Schnebli,H.P., M.A.Phillipps, and R.K.Barclay. 1979. Isolation and characterization of an enkephalin-degrading aminopeptidase from rat brain. *Biochim. Biophys. Acta* 569: 89-98.

29. Bukowska,A. 2002. Isolierung und biochemische Charakterisierung einer zytosolischen Aminopeptidase aus der humanen T-Zelllinie H9. Dissertation
30. Nagai,M., F.Kojima, H.Naganawa, M.Hamada, T.Aoyagi, and T.Takeuchi. 1997. Phebestin, a new inhibitor of aminopeptidase N, produced by *Streptomyces* sp. MJ716-m3. *J. Antibiot. (Tokyo)* 50: 82-84.
31. Kakuta,H, Y.Koiso, H.Takahashi, K.Nagasawa, and Y.Hashimoto. 2001. Novel Specific Puromycin-sensitive Aminopeptidase Inhibitors: 3-(2,6-Diethylphenyl)-2,4(1*H*,3*H*)quinazoline-dione and *N*-(2,6-Diethylphenyl)-2-amino-4*H*-3,1-benzoxazin-4-one. *HETEROCYCLES* Vol 55: 1433-1438.
32. McDonald,JK. 1986. Exopeptidases, in *Mammalian Proteases*. Academic Press, London.
33. Sakaguchi,S., N.Sakaguchi, M.Asano, M.Itoh, and M.Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155: 1151-1164.
34. Roncarolo,M.G., M.K.Levings, and C.Traversari. 2001. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193: F5-F9.
35. Seddon,B. and D.Mason. 1999. Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD45RC- cells and CD4(+)CD8 (-) thymocytes. *J. Exp. Med.* 189: 279-288.
36. Fowell,D. and D.Mason. 1993. Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J. Exp. Med.* 177: 627-636.
37. Read,S., V.Malmstrom, and F.Powrie. 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.
38. Suri-Payer,E., A.Z.Amar, A.M.Thornton, and E.M.Shevach. 1998. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 160: 1212-1218.
39. Groux,H., A.O'Garra, M.Bigler, M.Rouleau, S.Antonenko, J.E.de Vries, and M.G.Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389: 737-742.
40. Fontenot,J.D., M.A.Gavin, and A.Y.Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4: 330-336.
41. Khattri,R., T.Cox, S.A.Yasayko, and F.Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* 4: 337-342.
42. Hori,S., T.Nomura, and S.Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061.

43. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198: 1875-1886.
44. Roncarolo, M. G. and M. K. Levings. 2000. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 676-683.
45. Lehmann, J., J. Huehn, R. M. de la, F. Maszyzna, U. Kretschmer, V. Krenn, M. Brunner, A. Scheffold, and A. Hamann. 2002. Expression of the integrin α E β 7 identifies unique subsets of CD25⁺ as well as CD25⁻ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99: 13031-13036.
46. Thornton, A. M. and E. M. Shevach. 2000. Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.* 164: 183-190.
47. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β . *J. Exp. Med.* 194: 629-644.
48. Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak, and S. Sakaguchi. 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.
49. Shevach, E. M. 2002. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 389-400.
50. Powrie, F., J. Carlino, M. W. Leach, S. Mauze, and R. L. Coffman. 1996. A critical role for transforming growth factor- β but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB^(low) CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 183: 2669-2674.
51. Thornton, A. M. and E. M. Shevach. 1998. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 20;188: 287-296.
52. Shevach, E. M. 2001. Certified professionals: CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ suppressor T cells. *J. Exp. Med.* 193: F41-F46.
53. Mayer, L. and L. Shao. 2004. Therapeutic potential of oral tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 407-419.
54. Gorelik, L. and R. A. Flavell. 2002. Transforming growth factor- β in T-cell biology. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 46-53.
55. Ng, W. F., P. J. Duggan, F. Ponchel, G. Matarese, G. Lombardi, A. D. Edwards, J. D. Isaacs, and R. I. Lechler. 2001. Human CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 98: 2736-2744.
56. Shevach, E. M. 2000. Suppressor T cells: Rebirth, function and homeostasis. *Curr. Biol.* 10: R572-R575.

57. McHugh,R.S., M.J.Whitters, C.A.Piccirillo, D.A.Young, E.M.Shevach, M.Collins, and M.C.Byrne. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. 16: 311-323.
58. Fu,S., A.C.Yopp, X.Mao, D.Chen, N.Zhang, D.Chen, M.Mao, Y.Ding, and J.S.Bromberg. 2004. CD4+ CD25+ CD62+ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential. *Am. J. Transplant.* 4: 65-78.
59. Fiocchi,C. 1998. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115: 182-205.
60. Simon,G.L. and S.L.Gorbach. 1984. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 86: 174-193.
61. Bouma,G. and W.Strober. 2003. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 521-533.
62. MacDonald,T.T. 1994. Gastrointestinal inflammation. Inflammatory bowel disease in knockout mice. *Curr. Biol.* 4: 261-263.
63. Rath,H.C., J.S.Ikeda, H.J.Linde, J.Scholmerich, K.H.Wilson, and R.B.Sartor. 1999. Varying cecal bacterial loads influences colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats. *Gastroenterology* 116: 310-319.
64. Jalkanen,S., G.S.Nash, T.J.De los, R.P.MacDermott, and E.C.Butcher. 1989. Human lamina propria lymphocytes bear homing receptors and bind selectively to mucosal lymphoid high endothelium. *Eur. J. Immunol.* 19: 63-68.
65. Zeitz,M., H.L.Schieferdecker, R.Ullrich, H.U.Jahn, S.P.James, and E.O.Riecken. 1991. Phenotype and function of lamina propria T lymphocytes. *Immunol. Res.* 10: 199-206.
66. Parronchi,P., P.Romagnani, F. Annunziato, S.Sampognaro, A.Becchio, L.Giannarini, E.Maggi, C.Pupilli, F.Tonelli, and S.Romagnani. 1997. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am. J. Pathol.* 150: 823-832.
67. Schreiber,S., T.Heinig, U.Panzer, R.Reinking, A.Bouchard, P.D.Stahl, and A.Raedler. 1995. Impaired response of activated mononuclear phagocytes to interleukin 4 in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 108: 21-33.
68. Autschbach,F. and H.F.Otto. 1998. Pathogenese von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. *Chir Gastroenterol* 14: 98-103.
69. McGhee,J.R., J.Mestecky, C.O.Elson, and H.Kiyono. 1989. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J. Clin. Immunol.* 9: 175-199.
70. Okayasu,I., S.Hatakeyama, M.Yamada, T.Ohkusa, Y.Inagaki, and R.Nakaya. 1990. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98: 694-702.

71. Powrie,F., S.Read, C.Mottet, H.Uhlig, and K.Maloy. 2003. Control of immune pathology by regulatory T cells. *Novartis. Found. Symp.* 252:92-8; discussion 98-105, 106-14.: 92-98.
72. Liu,H., B.Hu, D.Xu, and F.Y.Liew. 2003. CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4. *J. Immunol.* 171: 5012-5017.
73. Elson,C.O., R.B.Sartor, G.S.Tennyson, and R.H.Riddell. 1995. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109: 1344-1367.
74. Sadlack,B., H.Merz, H.Schorle, A.Schimpl, A.C.Feller, and I.Horak. 1993. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 75: 253-261.
75. Kuhn,R., J.Lohler, D.Rennick, K.Rajewsky, and W.Muller. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75: 263-274.
76. Willerford,D.M., J.Chen, J.A.Ferry, L.Davidson, A.Ma, and F.W.Alt. 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity.* 3: 521-530.
77. Spencer,S.D., F.Di Marco, J.Hooley, S.Pitts-Meek, M.Bauer, A.M.Ryan, B.Sordat, V.C.Gibbs, and M.Aguet. 1998. The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *J. Exp. Med.* 187: 571-578.
78. Mombaerts,P., E.Mizoguchi, M.J.Grusby, L.H.Glimcher, A.K.Bhan, and S.Tonegawa. 1993. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 75: 274-282.
79. Powrie,F., M.W.Leach, S.Mauze, L.B.Caddle, and R.L.Coffman. 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.
80. Hollander,G.A., S.J.Simpson, E.Mizoguchi, A.Nichogiannopoulou, J.She, J.C.Gutierrez-Ramos, A.K.Bhan, S.J.Burakoff, B.Wang, and C.Terhorst. 1995. Severe colitis in mice with aberrant thymic selection. *Immunity.* 3: 27-38.
81. Matsumoto,S., Y.Okabe, H.Setoyama, K.Takayama, J.Ohtsuka, H.Funahashi, A.Imaoka, Y.Okada, and Y.Umesaki. 1998. Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. *Gut* 43: 71-78.
82. Sundberg,J.P., C.O.Elson, H.Bedigian, and E.H.Birkenmeier. 1994. Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology* 107: 1726-1735.
83. Podolsky,D.K. 1991. Inflammatory bowel disease (2). *N. Engl. J. Med.* 325: 1008-1016.
84. Koerber,J., and D.Stopnik. 1997. Ernährungstherapie bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. *Leber Magen Darm* 29: 52-56.
85. Sands,B.E. 1999. Novel therapies for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 28: 323-351.

86. Creed, T.J., M.R. Norman, C.S. Probert, R.F. Harvey, I.S. Shaw, J. Smithson, J. Anderson, M. Moorghen, J. Gupta, N.A. Shepherd, C.M. Dayan, and S.D. Hering. 2003. Basiliximab (anti-CD25) in combination with steroids may be an effective new treatment for steroid-resistant ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18: 65-75.
87. Rath, H.C., M. Schultz, R. Freitag, L.A. Dieleman, F. Li, H.J. Linde, J. Scholmerich, and R.B. Sartor. 2001. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect. Immun.* 69: 2277-2285.
88. Hans, W., J. Scholmerich, V. Gross, and W. Falk. 2000. The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 12: 267-273.
89. Ohkusa, T., M. Yamada, T. Takenaga, C. Kitazume, N. Yamamoto, M. Sasabe, I. Takashimizu, Y. Tamura, E. Sakamoto, and H. Kurosawa. 1987. [Protective effect of metronidazole in experimental ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium]. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 84: 2337-2346.
90. Walker, M.R., D.J. Kaspirowicz, V.H. Gersuk, A. Benard, M. Van Landeghen, J.H. Buckner, and S.F. Ziegler. 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J. Clin. Invest* 112: 1437-1443.
91. Levings, M.K., R. Sangregorio, and M.G. Roncarolo. 2001. Human cd25(+)cd4(+) regulatory T cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J. Exp. Med.* 193: 1295-1302.
92. Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger, and G. Schuler. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* 193: 1303-1310.
93. Nossal, G.J. 1994. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76: 229-239.
94. Kuwana, M. 2002. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum. Immunol.* 63: 1156-1163.
95. Macian, F., S.H. Im, F.J. Garcia-Cozar, and A. Rao. 2004. T-cell anergy. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 209-216.
96. Lechler, R., J.G. Chai, F. Marelli-Berg, and G. Lombardi. 2001. T-cell anergy and peripheral T-cell tolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 356: 625-637.
97. Miller, J.F. and W.R. Heath. 1993. Self-ignorance in the peripheral T-cell pool. *Immunol. Rev.* 133:131-50.: 131-150.
98. O'Garra, A. and P. Vieira. 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat. Med.* 10: 801-805.
99. Shevach, E.M. 2000. Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu. Rev. Immunol.* 18:423-49.: 423-449.

100. Sakaguchi,S., N.Sakaguchi, J.Shimizu, S.Yamazaki, T.Sakihama, M.Itoh, Y.Kuniyasu, T.Nomura, M.Toda, and T.Takahashi. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* 182:18-32.: 18-32.
101. Neurath,M.F., B.Weigmann, S.Finotto, J.Glickman, E.Nieuwenhuis, H.Iijima, A.Mizoguchi, E.Mizoguchi, J.Mudter, P.R.Galle, A.Bhan, F.Autschbach, B.M.Sullivan, S.J.Szabo, L.H.Glimcher, and R.S.Blumberg. 2002. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J. Exp. Med.* 195: 1129-1143.
102. Thornton,A.M., E.E.Donovan, C.A.Piccirillo, and E.M.Shevach. 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J. Immunol.* 172: 6519-6523.
103. de la,R.M., S.Rutz, H.Dorninger, and A.Scheffold. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 34: 2480-2488.
104. Schorle,H., T.Holtzschke, T.Hunig, A.Schimpl, and I.Horak. 1991. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 352: 621-624.
105. Maurus de la Rosa, Frank Hardung Alexander Scheffold. Identifizierung und Analyse regulatorischer T-Zellen. 2005. Electronic Citation
106. Scheffold,A. and F.Kern. 2000. Recent developments in flow cytometry. *J. Clin. Immunol.* 20: 400-407.
107. Tani,K., F.Ogushi, L.Huang, T.Kawano, H.Tada, N.Hariguchi, and S.Sone. 2000. CD13/aminopeptidase N, a novel chemoattractant for T lymphocytes in pulmonary sarcoidosis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 161: 1636-1642.
108. Ziaber,J., Z.Baj, J.Pasnik, H.Chmielewski, and H.Tchorzewski. 2000. Expression of aminopeptidase N (APN) on peripheral blood mononuclear cells' surface as a marker of these cells' transendothelial migration properties in the course of multiple sclerosis. *Mediators. Inflamm.* 9: 45-48.
109. Shimizu,T., K.Tani, K.Hase, H.Ogawa, L.Huang, F.Shinomiya, and S.Sone. 2002. CD13/aminopeptidase N-induced lymphocyte involvement in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46: 2330-2338.
110. Harbeson,S.L. and D.H.Rich. 1988. Inhibition of arginine aminopeptidase by bestatin and arphamenine analogues. Evidence for a new mode of binding to aminopeptidases. *Biochemistry* 20;27: 7301-7310.
111. Ino,K., K.Isobe, S.Goto, I.Nakashima, and Y.Tomoda. 1992. Inhibitory effect of bestatin on the growth of human lymphocytes. *Immunopharmacology* 23: 163-171.
112. Lendeckel,U., M.Arndt, A.Bukowska, J.Tadje, C.Wolke, T.Kahne, K.Neubert, J.Faust, A.Ittenson, S.Ansorge, and D.Reinhold. 2003. Synergistic action of DPIV and APN in the regulation of T cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* 524:123-31.: 123-131.

113. Lendeckel,U., T.Kahne, M.Arndt, K.Frank, and S.Ansorge. 1998. Inhibition of alanyl aminopeptidase induces MAP-kinase p42/ERK2 in the human T cell line KARPAS-299. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252: 5-9.
114. Lendeckel,U., B.Scholz, M.Arndt, K.Frank, A.Spiess, H.Chen, B.P.Roques, and S.Ansorge. 2000. Inhibition of alanyl-aminopeptidase suppresses the activation-dependent induction of glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) in human T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273: 62-65.
115. Abe,F., K.Shibuya, M.Uchida, K.Takahashi, H.Horinishi, A.Matsuda, M.Ishizuka, T.Takeuchi, and H.Umezawa. 1984. Effect of bestatin on syngeneic tumors in mice. *Gann* 75: 89-94.
116. Tsuruo,T., K.Naganuma, H.Iida, T.Yamori, S.Tsukagoshi, and Y.Sakurai. 1981. Inhibition of lymph node metastasis of P388 leukemia by bestatin in mice. *J. Antibiot. (Tokyo)* 34: 1206-1209.
117. Schorlemmer,H.U., K.Bosslet, G.Dickneite, G.Luben, and H.H.Sedlacek. 1984. Studies on the mechanisms of action of the immunomodulator Bestatin in various screening test systems. *Behring Inst. Mitt.* 157-173.
118. Aoyagi,K., N.Itoh, F.Abe, S.Abe, K.Uchida, M.Ishizuka, T.Takeuchi, and H.Yamaguchi. 1992. Enhancement by ubenimex (bestatin) of host resistance to *Candida albicans* infection. *J. Antibiot. (Tokyo)* 45: 1778-1784.
119. Ishizuka,M., F.Abe, S.Abe, K.Uchida, T.Ikeda, N.Ito, K.Aoyagi, H.Yamaguchi, and T.Takeuchi. 1992. Enhancement of host resistance to opportunistic infections by ubenimex (bestatin). *Adv. Exp. Med. Biol.* 319:193-200.: 193-200.
120. Coffey,P.J. and B.M.Burgering. 2004. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 889-899.
121. Ramsdell,F. 2003. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity.* 19: 165-168.
122. Bennett,C.L., J.Christie, F.Ramsdell, M.E.Brunkow, P.J.Ferguson, L.Whitesell, T.E.Kelly, F.T.Saulsbury, P.F.Chance, and H.D.Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27: 20-21.
123. Wildin,R.S., F.Ramsdell, J.Peake, F.Faravelli, J.L.Casanova, N.Buist, E.Levy-Lahad, M.Mazzella, O.Goulet, L.Perroni, F.D.Bricarelli, G.Byrne, M.McEuen, S.Proll, M.Appleby, and M.E.Brunkow. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* 27: 18-20.
124. Wildin,R.S., S.Smyk-Pearson, and A.H.Filipovich. 2002. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J. Med. Genet.* 39: 537-545.

125. Karagiannidis,C., M.Akdis, P.Holopainen, N.J.Woolley, G.Hense, B.Ruckert, P.Y.Mantel, G.Menz, C.A.Akdis, K.Blaser, and C.B.Schmidt-Weber. 2004. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114: 1425-1433.
126. Schubert,L.A., E.Jeffery, Y.Zhang, F.Ramsdell, and S.F.Ziegler. 2001. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J. Biol. Chem.* 276: 37672-37679.
127. Zelenay,S., T.Lopes-Carvalho, I.Caramalho, M.F.Moraes-Fontes, M.Rebelo, and J.Demengeot. 2005. Foxp3+ CD25- CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102: 4091-4096.
128. Fontenot,J.D. and A.Y.Rudensky. 2005. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat. Immunol.* 6: 331-337.
129. Fu,S., N.Zhang, A.C.Yopp, D.Chen, M.Mao, D.Chen, H.Zhang, Y.Ding, and J.S.Bromberg. 2004. TGF-beta Induces Foxp3 + T-Regulatory Cells from CD4 + CD25 - Precursors. *Am. J. Transplant.* 4: 1614-1627.
130. Schramm,C., S.Huber, M.Protschka, P.Czochra, J.Burg, E.Schmitt, A.W.Lohse, P.R.Galle, and M.Blessing. 2004. TGFbeta regulates the CD4+CD25+ T-cell pool and the expression of Foxp3 in vivo. *Int. Immunol.* 16: 1241-1249.
131. Markowitz,S.D. and A.B.Roberts. 1996. Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7: 93-102.
132. Wahl,S.M., D.A.Hunt, H.L.Wong, S.Dougherty, N.McCartney-Francis, L.M.Wahl, L.Ellingsworth, J.A.Schmidt, G.Hall, and A.B.Roberts. 1988. Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* 140: 3026-3032.
133. Reinhold,D., U.Bank, F.Buhling, U.Lendeckel, A.J.Ulmer, H.D.Flad, and S.Ansorge. 1994. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) inhibits DNA synthesis of PWM-stimulated PBMC via suppression of IL-2 and IL-6 production. *Cytokine* 6: 382-388.
134. Reinhold,D., U.Bank, F.Buhling, U.Lendeckel, and S.Ansorge. 1995. Transforming growth factor beta 1 inhibits interleukin-10 mRNA expression and production in pokeweed mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells and T cells. *J. Interferon Cytokine Res.* 15: 685-690.
135. Zheng,S.G., J.D.Gray, K.Ohtsuka, S.Yamagiwa, and D.A.Horwitz. 2002. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J. Immunol.* 169: 4183-4189.
136. Yamagiwa,S., J.D.Gray, S.Hashimoto, and D.A.Horwitz. 2001. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J. Immunol.* 166: 7282-7289.

137. Sher, A., R.T. Gazzinelli, I.P. Oswald, M. Clerici, M. Kullberg, E.J. Pearce, J.A. Berzofsky, T.R. Mosmann, S.L. James, and H.C. Morse. 1992. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol. Rev.* 127:183-204.: 183-204.
138. Szabo, S.J., S.T. Kim, G.L. Costa, X. Zhang, C.G. Fathman, and L.H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100: 655-669.
139. Lighvani, A.A., D.M. Frucht, D. Jankovic, H. Yamane, J. Aliberti, B.D. Hissong, B.V. Nguyen, M. Gadina, A. Sher, W.E. Paul, and J.J. O'Shea. 2001. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98: 15137-15142.
140. Shier, P., C.L. Hofstra, X.J. Ma, Y. Wu, K. Ngo, and W.P. Fung-Leung. 2000. Tbt-1, a new T-box transcription factor induced in activated Th1 and CD8+ T cells. *Immunogenetics* 51: 771-778.
141. Finotto, S., M.F. Neurath, J.N. Glickman, S. Qin, H.A. Lehr, F.H. Green, K. Ackerman, K. Haley, P.R. Galle, S.J. Szabo, J.M. Drazen, G.T. De Sanctis, and L.H. Glimcher. 2002. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295: 336-338.
142. Huang, C.T., C.J. Workman, D. Flies, X. Pan, A.L. Marson, G. Zhou, E.L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H.I. Levitsky, J.D. Powell, D.M. Pardoll, C.G. Drake, and D.A. Vignali. 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*. 21: 503-513.
143. Workman, C.J., D.S. Rice, K.J. Dugger, C. Kurschner, and D.A. Vignali. 2002. Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3). *Eur. J. Immunol.* 32: 2255-2263.
144. Workman, C.J., L.S. Cauley, I.J. Kim, M.A. Blackman, D.L. Woodland, and D.A. Vignali. 2004. Lymphocyte activation gene-3 (CD223) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo. *J. Immunol.* 172: 5450-5455.
145. Hannier, S., M. Tournier, G. Bismuth, and F. Triebel. 1998. CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. *J. Immunol.* 161: 4058-4065.
146. Triebel, F., S. Jitsukawa, E. Baixeras, S. Roman-Roman, C. Genevee, E. Viegas-Pequignot, and T. Hercend. 1990. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J. Exp. Med.* 171: 1393-1405.
147. Annunziato, F., R. Manetti, I. Tomasevic, M.G. Guidizi, R. Biagiotti, V. Gianni, P. Germano, C. Mavilia, E. Maggi, and S. Romagnani. 1996. Expression and release of LAG-3-encoded protein by human CD4+ T cells are associated with IFN-gamma production. *FASEB J.* 10: 769-776.
148. Kropf, J., J.O. Schurek, A. Wollner, and A.M. Gressner. 1997. Immunological measurement of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in blood; assay development and comparison. *Clin. Chem.* 43: 1965-1974.

149. Godfrey,W.R., D.J.Spoden, Y.G.Ge, S.R.Baker, B.Liu, B.L.Levine, C.H.June, B.R.Blazar, and S.B.Porter. 2005. Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* 105: 750-758.
150. Boirivant,M., I.J.Fuss, A.Chu, and W.Strober. 1998. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J. Exp. Med.* 188: 1929-1939.
151. Powrie,F., M.W.Leach, S.Mauze, S.Menon, L.B.Caddle, and R.L.Coffman. 1994. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity.* 1: 553-562.
152. Powrie,F. 1995. T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. *Immunity.* 3: 171-174.
153. Matsuura,T., G.A.West, K.R.Youngman, J.S.Klein, and C.Fiocchi. 1993. Immune activation genes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 104: 448-458.
154. Takizawa,H., N.Shintani, M.Natsui, T.Sasakawa, H.Nakakubo, T.Nakajima, and H.Asakura. 1995. Activated immunocompetent cells in rat colitis mucosa induced by dextran sulfate sodium and not complete but partial suppression of colitis by FK506. *Digestion* 56: 259-264.
155. Egger,B., F.Procaccino, I.Sarosi, J.Tolmos, M.W.Buchler, and V.E.Eysselein. 1999. Keratinocyte growth factor ameliorates dextran sodium sulfate colitis in mice. *Dig. Dis. Sci.* 44: 836-844.
156. Ni,J., S.F.Chen, and D.Hollander. 1996. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut* 39: 234-241.
157. Hans,W., J.Scholmerich, V.Gross, and W.Falk. 2000. The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Eur. J. Gastroenterol Hepatol.* 12: 267-273.
158. Kohm,A.P., P.A.Carpentier, and S.D.Miller. 2003. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by CD4+CD25+ regulatory T cells. *Novartis. Found. Symp.* 252:45-52; discussion 52-4, 106-14.: 45-52.
159. Huehn,J., K.Siegmund, J.C.Lehmann, C.Siewert, U.Haubold, M.Feuerer, G.F.Debes, J.Lauber, O.Frey, G.K.Przybylski, U.Niesner, R.M.de la, C.A.Schmidt, R.Brauer, J.Buer, A.Scheffold, and A.Hamann. 2004. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 199: 303-313.
160. Mottet,C., H.H.Uhlig, and F.Powrie. 2003. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 170: 3939-3943.
161. Kaser,A. and R.S.Blumberg. 2004. The other way round: colitis regulates regulatory T cells. *Gastroenterology* 126: 1903-1906.
162. Bluestone,J.A. 2005. Opinion: Regulatory T-cell therapy: is it ready for the clinic? *Nat. Rev. Immunol.* 5: 343-349.

163. Asseman,C., S.Mauze, M.W.Leach, R.L.Coffman, and F.Powrie. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 190: 995-1004.
164. Suri-Payer,E. and H.Cantor. 2001. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells. *J. Autoimmun.* 16: 115-123.
165. Tomoyose,M., K.Mitsuyama, H.Ishida, A.Toyonaga, and K.Tanikawa. 1998. Role of interleukin-10 in a murine model of dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scand. J. Gastroenterol* 33: 435-440.
166. Sands,B.E. 1999. Novel therapies for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin. North Am.* 28: 323-351.
167. Lindsay,J.O. and H.J.Hodgson. 2001. Review article: the immunoregulatory cytokine interleukin-10--a therapy for Crohn's disease? *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15: 1709-1716.
168. Tilg,H., C.van Montfrans, E.A.van den, A.Kaser, S.J.van Deventer, S.Schreiber, M.Gregor, O.Ludwiczek, P.Rutgeerts, C.Gasche, J.C.Koningsberger, L.Abreu, I.Kuhn, M.Cohard, A.LeBeaut, P.Grint, and G.Weiss. 2002. Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma. *Gut* 50: 191-195.
169. Shull,M.M., I.Ormsby, A.B.Kier, S.Pawlowski, R.J.Diebold, M.Yin, R.Allen, C.Sidman, G.Proetzel, and D.Calvin. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359: 693-699.
170. Hahm,K.B., Y.H.Im, T.W.Parks, S.H.Park, S.Markowitz, H.Y.Jung, J.Green, and S.J.Kim. 2001. Loss of transforming growth factor beta signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* 49: 190-198.
171. Asseman,C., S.Fowler, and F.Powrie. 2000. Control of experimental inflammatory bowel disease by regulatory T cells. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 162: S185-S189.
172. Matsuoka,K., N.Inoue, T.Sato, S.Okamoto, T.Hisamatsu, Y.Kishi, A.Sakuraba, O.Hitotsumatsu, H.Ogata, K.Koganei, T.Fukushima, T.Kanai, M.Watanabe, H.Ishii, and T.Hibi. 2004. T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease. *Gut* 53: 1303-1308.
173. Gorelik,L., S.Constant, and R.A.Flavell. 2002. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J. Exp. Med.* 195: 1499-1505.
174. Khattri,R., D.Kasprowicz, T.Cox, M.Mortrud, M.W.Appleby, M.E.Brunkow, S.F.Ziegler, and F.Ramsdell. 2001. The amount of scurf protein determines peripheral T cell number and responsiveness. *J. Immunol.* 167: 6312-6320.

175. Domek, M.J., F.Iwata, E.I.Blackman, J.Kao, M.Baker, A.Vidrich, and F.W.Leung. 1995. Anti-neutrophil serum attenuates dextran sulfate sodium-induced colonic damage in the rat. *Scand. J. Gastroenterol* 30: 1089-1094.
176. Axelsson, L.G., E.Landstrom, T.J.Goldschmidt, A.Gronberg, and A.C.Bylund-Fellenius. 1996. Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. *Inflamm. Res.* 45: 181-191.
177. Dieleman, L.A., B.U.Ridwan, G.S.Tennyson, K.W.Beagley, R.P.Bucy, and C.O.Elson. 1994. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 107: 1643-1652.
178. Kojouharoff, G., W.Hans, F.Obermeier, D.N.Mannel, T.Andus, J.Scholmerich, V.Gross, and W.Falk. 1997. Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 107: 353-358.
179. Neurath, M.F., I.Fuss, B.L.Kelsall, D.H.Presky, W.Waegell, and W.Strober. 1996. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance. *J. Exp. Med.* 183: 2605-2616.
180. Hara, J., H.Ohtani, T.Matsumoto, S.Nakamura, A.Kitano, T.Arakawa, H.Nagura, and K.Kobayashi. 1997. Expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 in macrophages and granulomas of Crohn's disease: demonstration of cell-to-cell contact with T lymphocytes. *Lab Invest* 77: 175-184.
181. Rugtveit, J., A.Bakka, and P.Brandtzaeg. 1997. Differential distribution of B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) costimulatory molecules on mucosal macrophage subsets in human inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* 110: 104-113.
182. Balfour, S.R. 1998. The role of luminal bacteria in colitis: more than an antigenic drive. *Eur. J. Clin. Invest* 28: 1027-1029.
183. Axelsson, L.G., E.Landstrom, and A.C.Bylund-Fellenius. 1998. Experimental colitis induced by dextran sulphate sodium in mice: beneficial effects of sulphasalazine and olsalazine. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 12: 925-934.
184. Horwitz, D.A., J.D.Gray, and S.G.Zheng. 2002. The potential of human regulatory T cells generated ex vivo as a treatment for lupus and other chronic inflammatory diseases. *Arthritis Res.* 4: 241-246.
185. Fukaura, H., S.C.Kent, M.J.Pietrusewicz, S.J.Khoury, H.L.Weiner, and D.A.Hafler. 1996. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest* 98: 70-77.
186. Hara, M., C.I.Kingsley, M.Niimi, S.Read, S.E.Turvey, A.R.Bushell, P.J.Morris, F.Powrie, and K.J.Wood. 2001. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J. Immunol.* 166: 3789-3796.

187. Blazar, B.B., A. Panoskaltsis-Mortari, B.B. Levine, C.C. June, P.P. Lucas, R. Gress, J.J. Serody, and P.P. Taylor. 2004. The role of CD4+CD25+ T regulatory (Treg) cells in allogeneic bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 10: 737.
188. Hofmann, B., K. Tao, L. Mai, and L.J. West. 2004. Acceptance of related and unrelated cardiac allografts in neonatally tolerized mice is cardio-specific and transferable by regulatory CD4+ T cells. *J. Heart Lung Transplant.* 23: 1069-1076.
189. Edinger, M., P. Hoffmann, J. Ermann, K. Drago, C.G. Fathman, S. Strober, and R.S. Negrin. 2003. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat. Med.* 9: 1144-1150.
190. Wolf, D., K. Hochegger, A.M. Wolf, H.F. Rumpold, G. Gastl, H. Tilg, G. Mayer, E. Gunsilius, and A.R. Rosenkranz. 2005. CD4+CD25+ Regulatory T Cells Inhibit Experimental Anti-Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis in Mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 1360-1370

8. Anhang

8.1 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema

„Verstärkung der suppressiven Eigenschaften von regulatorischen T-Zellen durch den Alanyl-Aminopeptidase-Inhibitor Phebestin *in vitro* sowie im DSS-Colitis Modell *in vivo*“

selbständig angefertigt und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Magdeburg, den 18.08.2005

8.2 Lebenslauf

Name	Janine Tadge
Geburtsdatum	19.01.1979
Geburtsort	Magdeburg

Schulbildung

1985-1992	POS Hugo Launicke in Magdeburg
1992-1997	Bettina von Arnim Gymnasium in Magdeburg
07/1997	Abitur am Bettina von Arnim Gymnasium

Studium

1997-1999	Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle/Saale
10/1999	Vordiplom Biologie
10/1999	Hochschulwechsel an die Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg in den Hauptstudiengang Neurobiologie
2001-2002	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Experimentelle Innere Medizin Magdeburg
10/2002	Diplomverteidigung, Abschluss zur Erlangung des Titels einer Diplombiologin
2002-2005	wissenschaftlicher Mitarbeiter und Anfertigung der Promotionsarbeit am Institut für Experimentelle Innere Medizin Magdeburg

8.3 Publikationen

Bukowska A, Tadge J, Arndt M, Wolke C, Kahne T, Bartsch J, Faust J, Neubert K, Hashimoto Y, Lendeckel U. Transcriptional regulation of cytosol and membrane alanyl-aminopeptidase in human T cell subsets. *Biol Chem.* 2003 Apr;384(4):657-6

Lendeckel U, Arndt M, Bukowska A, Tadge J, Wolke C, Kahne T, Neubert K, Faust J, Ittenson A, Ansorge S, Reinhold D. Synergistic action of DPIV and APN in the regulation of T cell function. *Adv Exp Med Biol.* 2003;524:123-31.

Ute Bank U, Tadge J, Täger M, Wolke C, Bukowska A, Ittenson A, Reinhold D, Helmuth M, Ansorge S, Shakespeare A, Vieth M, Hollenbach E, Malfertheiner P, Naumann M, Lendeckel U. Inhibition of alanyl-aminopeptidase on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by phebestin ameliorates colitis via preservation of their suppressive activity (in Vorbereitung)

Preller V, Gerber A, Wrenger S, Togni M, Marguet D, Tadge J, Lendeckel U, Röcken C, Schraven B, Martin R, Ansorge S, Brocke S, Reinhold D. CD26 control of CNS inflammation and autoimmunity (submitted)

Wolke C, Tadge J, Bukowska A, Täger M, Bank U, Ittenson A, Ansorge S, Lendeckel U. Characterization of the human T-cell line KARPAS-299 as a natural regulatory T-cell (submitted)

Bank U, Tadge J, Helmuth M, Stefin S, Täger M, Wolke C, Wischeropp A, Ittenson A, Reinhold D, Ansorge S, Lendeckel U. Dipeptidylpeptidase IV and Alanyl-Aminopeptidases as a new target complex for treatment of autoimmune and inflammatory diseases – proof of concept in a mouse model of colitis (*Adv Exp Med Biol.* in press)

Präsentationen:

Tadge J, Lendeckel U, Ansorge S, Reinhold D, Ittenson A. Effects of inhibitors of alanyl-aminopeptidase on TGF- β 1-production of human regulatory T-cells. 20th Winter School in Tiers/St. Zyprian

8.4 Danksagung

Bei allen, die mir beim Anfertigen dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. habil Uwe Lendeckel für die Überlassung und Betreuung des interessanten Dissertationsthemas und für die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Siegfried Ansorge danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die stete Diskussionsbereitschaft.

Frau Dr. Ute Bank und Dr.med. Michael Täger danke ich für die große Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche, sowie für die wiederholten Anregungen und Denkanstöße.

Ein besonderer Dank geht an das „Kellerteam“ des Institutes für Experimentelle Innere Medizin für die engagierte Unterstützung bei allen praktischen Arbeiten, sowie für die überaus angenehme Atmosphäre im Labor.

Auch allen weiteren Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle Innere Medizin ein herzliches Dankeschön für ihre Hilfsbereitschaft.

Für die Unterstützung beim histologischen Scoring der Dickdarmschnitte bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil Peter Malfertheiner.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Immunologie und des IMTM, welche bei der Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben recht herzlich bedanken.

Und nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinem Freund Thomas für die liebevolle Unterstützung und Motivation danken.