

Aus der
Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Cristoph Klein

Einfluss exklusiver enteraler Ernährungstherapie auf die Immunregulation bei Morbus Crohn im Kindes- und Jugendalter

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwigs-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Gabor Grewer-Katona

geboren in Kecskemet, Ungarn

München 2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Philip Bufler

Mitberichterstatter: PD Dr. Florian Kühn

PD Dr. Fabian Schnitzler

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Tobias Schwerd

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2021

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGE ABFASSUNG
DER ARBEIT

Hiermit erkläre ich, Gabor Grewer-Katona, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt vorliegender Dissertation stehen und, dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.

Alle aus fremden Quellen und von anderen Personen übernommene Materialien, die in der Arbeit verwendet wurden oder auf die direkt Bezug genommen wird, wurden als solche kenntlich gemacht.

Köln, den 09.12.2021
Ort, Datum

Gabor Grewer-Katona
geb. Gabor Katona

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen im Kindes- und Jugendalter	7
1.1.1 Klinische Präsentation und Diagnose von Morbus Crohn im Kindesalter	7
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese von MC im Kindes- und Jugendalter	10
1.1.3 Th-Zell-Subgruppen, ihre Funktion und Rolle bei der Pathogenese vom MC	13
1.2 Therapiemöglichkeiten von pädiatrischem Morbus Crohn	17
1.2.1 Übersicht möglicher Therapiearten bei pädiatrischem MC	18
1.2.2 Bedeutung der EET in der Therapie von pädiatrischem MC	20
1.3 Fragestellung	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Studiendesign und Patientenproben	24
2.2 Exklusive Ernährungstherapie	25
2.3 Bestimmung der klinischen, laborchemischen und histopathologischen Krankheitsaktivität	26
2.3.1 Anthropometrische Daten	26
2.3.2 wPCDAI	26
2.3.3 Entzündungswerte	27
2.3.4 Histopathologische Einteilung des Krankheitsaktivitätsgrades	27
2.4 Geräte und Reagenzien	28
2.4.1 Geräte	28
2.4.2 Reagenzien der Durchflusszytometrie	29
2.4.3 Reagenzien der Immunfluoreszenzhistochemie	29
2.4.4 Reagenzien zum Umgang mit Immunhistochemischen Proben	31
2.5 Isolation von mononukleären Zellen (PBMCs) aus dem peripheren Blut	31
2.6 Durchflusszytometrie	32
2.6.1 Allgemeine Funktionsprinzipien	32
2.6.2 Bestimmung von Oberflächenmolekülen	33
2.6.3 Bestimmung des intrazellulären Transkriptionsfaktors Foxp3	33
2.7 Immunfluoreszenzhistochemische Methoden	35
2.7.1 Entparaffinisierung und Rehydrierung Paraffineingebetteter Gewebe	35
2.7.2 Antigendemaskierung	35
2.7.3 Blocken der endogenen Peroxidase-Aktivität	35

2.7.4	Blocken unspezifischer Epitope	36
2.7.5	Markieren mit dem primären und sekundären Antikörper.....	36
2.7.6	Signalamplifikation mit Fluoreszenzfarbstoffen	37
2.7.7	Kernfärbung und Fertigstellen der Proben	38
2.7.8	Besonderheiten bei Mehrfachfärbungen	38
2.7.9	TUNEL Assay	39
2.7.10	Signalamplifikation und letzte Schritte für übliche Immunhistochemie.....	39
2.7.11	Fotografie und Bildanalyse	39
2.8	Statistik	46
3.	Ergebnisse	47
3.1	Charakterisierung der Studienpatienten	47
3.2	Klinischer Verlauf	49
3.2.1	Verbesserung des wPCDAI und des Körpergewichts	49
3.2.2	Verbesserung der Entzündungswerte im peripheren Blut	50
3.3	Einfluss der EET auf den histopathologischen Entzündungsaktivitätsgrad	52
3.4	Durchflusszytometrische Untersuchung des peripheren Blutes.....	53
3.4.1	Bestimmung der T-Zellen im peripheren Blut.....	53
3.4.2	Bestimmung der T-Helfer-Zellsubpopulationen im peripheren Blut	54
3.4.3	Bestimmung der Th-Subpopulationen innerhalb der <i>Gut-Homing</i> T-Zellen im peripheren Blut.....	56
3.5	Immunfluoreszenzhistochemische Untersuchung der Lamina propria	59
3.5.1	Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen in der Lamina propria	59
3.5.2	Erweiterte Charakterisierung des entzündlichen Infiltrats der Lamina propria	64
4.	Diskussion.....	71
4.1	Übersicht über die klinisch-experimentellen Ergebnisse.....	71
4.2	Interpretation der Ergebnisse vor dem Hintergrund der Literatur	73
4.2.1	Repräsentative Kohorten pädiatrischer Patienten mit Morbus Crohn	73
4.2.2	Klinischer Verlauf unter EET im Vergleich mit anderen konventionellen Therapieformen	75
4.2.3	Veränderungen des intestinalen und systemischen Immunzellkompartments bei kindlichem MC unter EET	76
4.2.4	Veränderungen des Immunzellkompartments bei MC unter EET im Vergleich mit direkt immunmodulatorischen Therapieformen	81
5.	Zusammenfassung	84
6.	Literaturverzeichnis	85
7.	Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	100
8.	Danksagung	104

9. Publikationen.....	105
10. Lebenslauf.....	105

1. Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen im Kindes- und Jugendalter

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED, im englischen Sprachraum als *Inflammatory Bowel Disease, IBD* bezeichnet) sind Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts (GIT) mit rezidivierenden Entzündungen, deren Pathogenese nicht abschließend geklärt ist. Inzidenz und Prävalenz der CED haben in den letzten 60 Jahren weltweit, sowohl in Industrieländern, als auch in Entwicklungsländern deutlich zugenommen [1-3]. Bei 20-25% aller Patienten mit CED wird die Erstdiagnose vor dem zwanzigsten Lebensjahr gestellt und etwa jeder vierte pädiatrische Patient ist bei Erstdiagnose jünger als 10 Jahre [1, 4]. Die weltweite Inzidenz der pädiatrischen CED beträgt 5-11/100.000 Kinder und Jugendliche <18 Jahren pro Jahr [1]. Die Inzidenz für pädiatrischen Morbus Crohn in Deutschland beträgt ca. 6,6/100.000 und für pädiatrische Colitis ulcerosa 3,0-3,9/100.000 [5, 6]. Eine aktuelle Studie schätzte mit Hilfe von Daten einer großen gesetzlichen Krankenversicherung die Inzidenz für pädiatrische CED in Deutschland im Jahr 2012 auf 17,41/100.000 [7]. Demnach werden in Deutschland jährlich etwa 2000-2600 pädiatrische Patienten neu mit CED diagnostiziert [7]. Daher wird CED in mehreren Veröffentlichungen als ein „wachsendes, globales Problem der Kindergesundheit“ bezeichnet [8, 9].

Neben Morbus Crohn (MC, *Crohn's Disease, CD*, benannt nach Burrill B. Crohn (1884-1983)) und Colitis ulcerosa (CU, *Ulcerative Colitis, UC*) wird eine dritte Entität, die unklassifizierte CED (CED-U, *IBD Unclassified, IBD-U*) unterschieden [10], die diagnostiziert wird, wenn eine CED im Dickdarm nach vollständiger Diagnostik keiner der beiden Hauptformen MC oder CU zugeordnet werden kann [10].

Thema vorliegender Dissertation ist der Einfluss der exklusiven enteralen Ernährungstherapie (EET) auf die Immunregulation vom pädiatrischen MC, weshalb in der weiteren Abhandlung nicht weiter auf CU oder CED-U eingegangen wird.

1.1.1 Klinische Präsentation und Diagnose von Morbus Crohn im Kindesalter

MC kann den gesamten GIT von oral bis anal betreffen, wobei es typischerweise zu einer transmuralen, diskontinuierlichen (segmentalen) Entzündung (sogenannten *skip lesions*) kommt. Diese kann von tiefen Ulzerationen oder Strikturen und Stenosen begleitet werden und sich charakteristischerweise makroskopisch in Form eines Pflastersteinreliefs äußern. Mikroskopisch finden sich Epitheloid-zellige Granulome [3, 11]. Klinische Symptome können Durchfall, Fieber, abdominale Schmerzen, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit,

Wachstumsverzögerung, enorale Aphten oder perianale Entzündungen sein, die sich in Fissuren, Fisteln oder perianalen Abszessen äußern [3, 11]. Außerdem kann es zu extraintestinalen Beschwerden kommen. Dazu zählen Entzündungen der Augen, Haut oder Gelenken [12]. Als Folge des chronischen Entzündungsgeschehens kann es bei Kindern und Jugendlichen zu Gewichtsverlust, Wachstumsstörungen, verminderter Knochenmasse und einer verzögerten Pubertät, sowie zu psychischen Belastungen kommen [13, 14]. Pathophysiologisch werden ein Gewichtsverlust bzw. eine mangelnde Gewichtszunahme durch verschiedene Faktoren erklärt. Entzündungsmediatoren (pro-inflammatorische Zytokine) haben eine appetithemmende Wirkung. Außerdem reduzieren die Kinder wegen Bauchschmerzen bewusst oder unbewusst die Nahrungsaufnahme [14]. Zudem kann ein langstreckiger Darmbefall zu Resorptionsstörungen wichtiger Mikronährstoffe (Folsäure, Vitamin-A, -B12, -D, Eisen, Zink, Selen) führen [14, 15]. Gleichzeitig besteht ein erhöhter Verlust an wichtigen Nährstoffen, z.B. durch Diarrhoe. Dabei hat der Körper gerade bei einer akuten Inflammation einen erhöhten Kalorien- und Nährstoffbedarf [14]. Wachstumsstörungen oder ein verzögerter Pubertätsbeginn sind für Kinder und Jugendliche sehr belastend, da sie sich hierdurch deutlich von ihrer Peer-Gruppe unterscheiden. So können im Verlauf auch reaktive Depression entstehen [4, 14].

Die Diagnose einer pädiatrischen CED sollte durch einen ausgebildeten pädiatrischen Gastroenterologen in entsprechenden Zentren und nach den überarbeiteten Kriterien der Porto-Gruppe der ESPGHAN (*European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*) gestellt werden (Tabelle 1.1.1) [10, 11]. Grundsätzlich sollte der Anamneseerhebung, körperlichen Untersuchung, sowie der Labordiagnostik immer eine obere und untere Endoskopie mit Stufenbiopsie für die Histologie und eine Dünndarmdarstellung folgen [10].

Als Labordiagnostik sind allgemeine und spezielle Blutuntersuchungen, sowie Stuhluntersuchungen sinnvoll. Allgemeine Blutuntersuchungen sollten ein großes Blutbild (BB), die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), C-reaktives Protein (CRP), Albumin, sowie die Lebertransaminasen und Gamma-Glutamyltransferase (γ -GT) beinhalten. Bei einer CED sind im BB typischerweise eine Leukozytose, Thrombozytose und eine mikrozytäre Anämie zu erwarten, BSG und CRP sind erhöht, Albumin erniedrigt, die Transaminasen und γ -GT nur bei Lebermitbeteiligung verändert [10, 11]. Als weiterführende Labordiagnostik können im Blut Antikörper, wie gegen *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) oder anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper mit perinukleärer Anfärbung (pANCA) bestimmt werden. Diese können bei der Differenzierung einer CED hilfreich sein, zudem scheint das Vorhandensein von ASCA bei Kindern mit CED mit einer sowohl klinisch als auch endoskopisch höheren

Krankheitsaktivität einhergehen [16]. Keine der beiden sind jedoch spezifisch für einen MC oder eine CU und haben eine Sensitivität von nur 60% [11, 17, 18]. Obwohl z.B. CRP und Albumin mit Krankheitsschwere und –aktivität korrelieren, kann bei unauffälligen Laborwerten keinesfalls eine CED ausgeschlossen werden. Eine sehr gute Sensitivität (>95%) hat dagegen die Bestimmung des Entzündungsmarkers, Calprotectin im Stuhl. Eine Erhöhung ist jedoch nicht spezifisch für eine CED, da es unter anderem auch bei Infektionen des GITs erhöht sein kann [11, 17, 19]. Daher sollte bei erhöhtem Calprotectin vor Durchführung einer Endoskopie der Stuhl mikrobiologisch auf pathogenen Keimen untersucht werden [10, 11, 17]. Zur Diagnose einer Dünndarmbeteiligung stehen eine Magnetresonanzenzenterographie (MRE) nach intravenöser Kontrastmittel-Gabe (i.v.-KM) und Weitstellung des Darms mittels Mannitollösung oder eine Videokapselendoskopie zur Verfügung, [10, 11, 20, 21]. Konventionelle Röntgenaufnahmen oder eine Computer Tomographie (CT) sind nur noch in Einzelfällen indiziert [11, 21]. Eine Sonographie alleine genügt nicht, kann aber gut als nichtinvasive Verlaufskontrolle durchgeführt werden [11, 21]. Im Rahmen einer ausführlichen Diagnostik soll ein besonderes Augenmerk auf die sogenannte POPO Kriterien (*Predictors of Poor Outcome*) fallen. Sieben Kriterien, wie z.B. tiefe kolonische Ulzerationen, perianaler Befall, schwere Osteoporose, haben hierbei Einfluss auf die Wahl der optimalen Therapie [22].

Nach der Diagnose kann der MC-Phänotyp mit der Paris-Klassifikation beschrieben werden. Darin fließen das Alter bei Diagnose, das Befallsmuster, das Krankheitsverhalten und das Vorliegen einer Wachstumsretardierung ein. Die Paris-Klassifikation für Kinder basiert auf der Montreal-Klassifikation für Erwachsenen (*siehe Tabelle 1.1.1*) [23]. Die Krankheitsaktivität von MC wird gewöhnlich mit Hilfe des *Pediatric Crohn's Disease Activity Index* (PCDAI) eingestuft (*Tabelle 1.1.1*) [24, 25]. Dieser wurde bereits mehrfach modifiziert und verbessert, wobei der mathematisch gewichtete PCDAI (wPCDAI) praktisch besser durchführbar ist und die Abstufung der Aktivitäten feiner unterscheidet [24].

Kriterien Klassifikation Score	Revidierte Porto-Kriterien	Paris Klassifikation	wPCDAI
Anwendungsbereich	Diagnostik	Krankheitsphänotyp	Krankheitsaktivität bei pädiatrischem MC
Kriterien bzw. Einstufung	Anamnese Körperliche Untersuchung Laborchemie Endoskopie (makroskopisch) Histologie Bildgebung	Alter Befallsmuster Verhalten Wachstum	Bauchschmerzen Allgemeinbefinden Stuhlfrequenz BSG Albumin Gewichtsverlauf Perianaler Befall Extraintestinale Manifestationen
Andere, ältere oder weniger sensitive Scores	Porto-Kriterien	Montreal-Klassifikation	PCDAI abbrPCDAI shPCDAI modPCDAI

Tabelle 1.1.1 Scores, Kriterien und Indices bei der Diagnose, Klassifikation und Krankheitsaktivitätseinteilung von Morbus Crohn im Kindes- und Jugendalter. wPCDAI: *weighted Pediatric Crohn's Disease Activity Index* (gewichteter pädiatrischer Morbus Crohn Krankheitsaktivitätsindex), abbrPCDAI: *abbreviated Pediatric Crohn's Disease Activity Index* (gekürzter pädiatrischer Morbus Crohn Krankheitsaktivitätsindex), shPCDAI: *short Pediatric Crohn's Disease Activity Index* (kurzer pädiatrischer Morbus Crohn Krankheitsaktivitätsindex), modPCDAI: *modified Pediatric Crohn's Disease Activity Index* (modifizierter pädiatrischer Morbus Crohn Krankheitsaktivitätsindex).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese von MC im Kindes- und Jugendalter

Die Ätiologie und Pathogenese der CED sind trotz intensiver Forschungen weiterhin nicht vollständig aufgeklärt.

Ein, im Vergleich zur Normalbevölkerung, um 10- bis 35-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko für CED bei Verwandten ersten Grades lässt eine genetische Veranlagung vermuten [3]. Aktuelle Zwillingsstudien berichten über eine Konkordanz bei monozygoten Zwillingen zwischen 16% und 36% [1]. Das stärkste Risikogen für einen MC ist *NOD2 (Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2)*.

30-40% aller Patienten mit MC weisen eine Mutation im Gen *NOD2* auf. *NOD2* kodiert für das gleichnamige Protein und ist auf 16q12 positioniert [26-31]. Dieses ist ein PRR (*Pattern-Recognition-Receptor*), der von Makrophagen, dendritischen Zellen, Paneth-Zellen, endothelialen Zellen und Epithelzellen intrazellulär exprimiert und durch Muramyldipeptid von bakteriellen Zellwandbestandteilen aktiviert wird [29, 32, 33]. Er aktiviert wiederum über den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*Nuclear-Factor-Kappa-Light-Chain-Enhancer*) und die MAP-

Kinasen (*Mitogen-Activated-Protein*) Signalwege, die zur Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen, wie Interleukin-6 (IL-6), IL-12, IL-23 und IL-1 β , sowie Tumornekrosefaktor (TNF) führen [29, 31, 34, 35]. Die am Ende des Signalweges produzierten Zytokine wirken entweder direkt proinflammatorisch (TNF), stimulieren die Proliferation von pro-inflammatorischen Zellen wie Th17- (IL-1 β , IL-6, IL-23) und Th1- (IL-12) positiven T-Zellen oder hemmen die Proliferation anti-inflammatorischer, regulatorischer T-Zellen (Treg) (IL-6, IL-23) [26, 31, 36, 37]. Die entgegengesetzte Herunterregulierung pro-inflammatorischer Zytokine erfolgt zum einen durch inhibitorische Zytokine, wie TGF- β (*Transforming-Growth-Factor β*) und IL-10, zum anderen durch chronische Stimulation von PRRs, vor allem von NOD2 Rezeptoren, durch bakterielle Peptidoglykanen. Die Aktivierung von NOD2 fördert auch den intrazellulären Verdau von Bakterien durch Phagozyten des angeborenen Immunsystems. Dieser Prozess wird als Autophagie bezeichnet. Hierbei sind die Gene *ATG16L1* (*Autophagy-Related-16-like*) und *IRGM* (*Immunity-Related-GTPase-M-Protein*) bedeutend [26, 31, 38-41]. Mutationen in diesen Genen sind nach *NOD2*-Mutationen die am häufigsten mit MC vergesellschafteten genetischen Risikofaktoren [26, 30, 38-40, 42, 43].

Die Zunahme der CED-Patienten in westlichen Nationen in den letzten Jahrzehnten, kann durch genetische Risikofaktoren allein nicht erklärt werden. Zahlreiche Umweltfaktoren wurden mit einem erhöhten Risiko für eine CED in Verbindung gebracht, wie z.B. ein westlicher Ernährungsstil, eine frühe Appendektomie, die Einführung von Kühlschränken (sog. *Cold chain* Hypothese), das Rauchen, die Einnahme von nicht-steroidalen Antirheumatika, das verminderte Stillen oder wiederholte Antibiotikatherapien [3].

Studien zeigten, dass die Inzidenz von (pädiatrischer) CED in Familien aus Entwicklungs- oder Schwellenländern, die in westliche Nationen eingewandert sind, nach der ersten Generation deutlich ansteigt [1, 11, 44]. Unter den kausativen Triggern werden unter anderem eine erhöhte Nutzung von Antibiotika, Entfallen der protektiven Wirkung vom Stillen durch kürzere Stilldauer oder der westliche Ernährungsstil vermutet. Durch eine erhöhte Anwendung von Antibiotika kommt es zu einer temporären Einschränkung der mikrobiellen Diversität, welche protektiv für eine CED ist [3, 45, 46]. Eine westliche Ernährung mit ihrer hohen Zufuhr von Fett und Zucker und wenig Ballaststoffen hat ebenfalls einen negativen Effekt auf das Darm-Mikrobiom. Ferner führen das Aufbewahren von Lebensmitteln in Kühlschränken und die erhöhte Lebensmittel-Hygiene zu einer Reduktion der oral aufgenommenen Keimzahl und Diversität. Dadurch können Pathobionten im Gastrointestinaltrakt (GIT) eine Nische einnehmen und die Entstehung einer CED begünstigen [47]. Eine andere Theorie, die Hygienetheorie ist durch die allgemein hohen hygienischen Standards in westlichen Ländern erklärt [45, 46, 48-51].

In Anbetracht des Nord-Süd-Gefälles der Krankheitsinzidenz wird auch die Rolle von immunmodulierendem Vitamin-D diskutiert. Ein Mangel senkt die Aktivität der NOD2-Rezeptoren und begünstigt dadurch die Differenzierung von proinflammatorischen T-Helferzellen, Th1 und Th17 [52-56].

Weil der GIT direkten Zugang zur Umwelt hat, findet sich im Darm eine sehr hohe Präsenz an Mikroorganismen, wie etwa 500 unterschiedliche Bakterienspezies, sowie diverse Viren und Protozoen, die symbiotisch, aber auch fakultativ oder obligat pathogen sein können [26, 57]. Alle Organismen im Darm werden zusammengefasst unter dem Begriff Mikrobiom. Die Bakterien des gesunden intestinalen Mikrobioms stellen essenziellen Nahrungsbestandteile her und modulieren die Genexpression, die für wichtige Funktionen kodieren. Sie stärken die mukosale Barriere unter anderem durch eine gesteigerte Angiogenese, sowie durch die postnatale Entwicklung des Intestinums und des intestinalen Immunsystems und sind so für die Infektionsabwehr relevant [58, 59]. Pathogene Erreger werden durch ein stabiles Mikrobiom gehemmt und vom Immunsystem an einer Invasion der Darmwand gehindert. Entsteht ein mikrobielles Ungleichgewicht, kann es zu einer Dominanz von potenziell schädlichen Mikroben im GIT kommen. Diese stimulieren das Darmimmunsystem jedoch überproportional stark, welches zu einer inadäquaten intestinalen Inflammation führen kann, wie es bei MC zu sehen ist. Welche Bakterien kausativ für eine proinflammatorische Imbalance verantwortlich sind, ist noch nicht ausreichend erforscht [60].

Mukosales Immunsystem

Physiologisch ist eine kontinuierliche, feine Interaktion zwischen Darmmikrobiom und Immunsystem, die in mehreren Ebenen stattfindet. Bereits im Darmlumen werden Bakterien, die sich dem Epithel nähern durch das angeborene Abwehrsystems abgewehrt. So werden die intestinalen Mikroben durch eine Schleimschicht vom Epithel ferngehalten [58]. Dieser Mukus enthält ausserdem reichlich antimikrobielle Substanzen, wie α -Defensine und Immunglobulin-A (IgA), [61-63]. α -Defensine werden von spezialisierten Epithelzellen, sogenannten Paneth-Zellen im terminalen Ileum produziert [26, 58]. Die Sekretion, der für die Mukusschicht nötigen Substanzen wird von den Goblet-Zellen übernommen (*Abb. 1.1.1*) [63, 64]. Bei Störungen der Sekretion antimikrobieller Substanzen, insbesondere von α -Defensinen, wird durch die fehlende „Vorabwehr“ die epitheliale Regeneration beeinträchtigt und es entstehen Erosionen und Ulzera [65, 66]. Die nächste Stufe der angeborenen Immunabwehr wird mechanisch durch Epithelzellen und ihre *Tight-Junctions* gebildet [67]. Die Durchgängigkeit des Interzellulärraums ist beim MC pathologisch erhöht [68]. Epithelzellen exprimieren auch MHC II Molekülen (*Major Histocompatibility Complex II*), die mikrobielle Antigene den CD4 (*Cluster of Differentiation 4*) positiven Th-Zellen präsentieren und so auch

das adaptive Immunsystem einschalten [58, 69, 70]. Zusätzlich besitzen Epithelzellen an ihren Oberflächen PRRs, wie TLR4 (*Toll-like Receptor 4*) und NOD2, deren Aktivierung durch bakterielle Liganden und die Sekretion von Zytokinen zu einer gesteigerten Proliferation der pro-inflammatorischen Effektorzellen Th17 und Th1 führen (*Abb. 1.1.1*).

Das Epithel von Payer-Plaques enthält sogenannte M-Zellen, die in der Lage sind Antigene auf der luminalen Seite zu erkennen und diese dann auf ihrer basolateralen Seite zu den antigenpräsentierenden Zellen (*Antigen Presenting Cells*, APCs) in der Regel zu dendritischen Zellen zu transportieren [71, 72]. Da dendritische Zellen eine besonders hohe Zahl an PRRs aufweisen, können sie gut zwischen pathogenen und physiologischen Antigenen unterscheiden und die T-Zell-Antwort dementsprechend triggern oder unterdrücken [73]. Hierbei kommt ihnen durch die Stimulation der Differenzierung naiver T-Zellen in pro-inflammatorischen Th1, Th2 oder Th17-Zellen, oder aber in entzündungshemmende Treg-Zellen eine große Bedeutung zu [74].

Sollten als pathogen eingestufte Erreger dennoch das Epithel passieren, werden sie durch eine hohe Anzahl an residenten Zellen der angeborenen Immunabwehr, wie Makrophagen, dendritische Zellen, sowie durch Zellen des adaptiven Immunsystems, wie T-Zellen und IgA-produzierende B-Zellen bekämpft [75-77]. Auch sorgen bei Inflammation in der Lamina propria Zytokine des oben beschriebenen IL-23-Th17-Signalweges für das Aufrechterhalten der Entzündung [26]. Um die Immuntoleranz aufrecht zu halten, sind in der Lamina propria auch Treg-Zellen, sowie deren anti-inflammatorische Zytokine TGF- β und IL-10 reichlich vorhanden (*Abb. 1.1.1*) [78-80].

Diese Zellen der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr und ihre Zytokine sind direkt für die Entstehung oder Abheilung des MCs verantwortlich und bieten so gute Angriffspunkte für die Therapie, aber auch das Monitoring des MCs.

1.1.3 Th-Zell-Subgruppen, ihre Funktion und Rolle bei der Pathogenese vom MC

Die Differenzierung der Th-Zell-Subgruppen wird durch Zytokine gelenkt, die entweder von anderen Immunzellen (z.B. APCs) freigesetzt oder von den jeweiligen Subgruppen selbst produziert werden und so für eine positive Rückkopplung sorgen und gleichzeitig die Entstehung anderer Subgruppen hemmen können. Damit auf die Signale der Zytokine eine erhöhte (oder herabgesetzte) Proliferation folgt, sind intranukleäre Transkriptionsfaktoren nötig [81]. Ursprünglich wurden die Th1-Zellen, die durch den Transkriptionsfaktor T-bet (*T box expressed in T cells*) und das Leitzytokin IFN- γ (*Interferon-gamma*) charakterisiert sind, von den Th2-Zellen, gekennzeichnet von GATA3 (*GATA Binding Protein3*) und dem charakteristischen IL-4 unterschieden [82-84]. Die Proliferation von Th1-Zellen wird von den

Zytokinen IL-12, IL-27 und IFN- γ getriggert und Th1-Zellen setzen selber neben IFN- γ andere direkt inflammatorisch wirkende Zytokine wie TNF und IL-6 frei (*Abb. 1.1.1*) [31]. Beim MC wurde mehrfach eine erhöhte Produktion von IL-12 durch Makrophagen beobachtet, welche nach Kontakt mit Bakterien stimuliert wird [31, 85-87]. Des Weiteren wurden in mehreren Studien in der Lamina propria von Patienten mit MC erhöhte Mengen von TNF und IFN- γ gefunden [85, 88-90]. Vor allem am Anfang der Entzündung wird die Rolle von Th1-Zellen und IFN- γ weiterhin als unerlässlich betrachtet [91].

Th17-Effektorzellen sind durch IL-17 und den Transkriptionsfaktor ROR γ t (*Retinoid-Acid-Related-Orphan-Receptor-Gamma-t*) charakterisiert [92, 93]. Ihre Differenzierung und Proliferation wird durch die gleichzeitige Anwesenheit von TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-21 und IL-23 getriggert (*Abb. 1.1.1*) [31, 36, 37]. Welche Zytokin-Kombination hierfür genau nötig ist, ist bisweilen unklar, wobei bei Menschen allein TGF- β mit IL-6 im Gegensatz zu Mausmodellen für die Differenzierung von Th17-Zellen nicht ausreicht [94-100]. Th17 Zellen sind für die Aktivierung pro-inflammatorischer Zellen, v.a. neutrophilen Granulozyten verantwortlich [31, 36]. Zahlreiche Studien deuten auf die Schlüsselrolle des IL-23-Th17 Signalweges bei der Pathogenese von CED hin [37, 89, 90, 101-105]. Th17-Zellen produzieren die pro-inflammatorische Zytokine IL-17, IL-21, IL-22, IL-26, TNF und CCL-20 (*CC-Chemokine Ligand 20*), wobei IL-17 und TNF besondere Bedeutung im Bezug vom MC zukommt [26, 31].

Essentielle immunsuppressive Wirkung hat die CD4⁺ Subgruppe der Treg-Zellen, die den obigen pro-inflammatorischen Th-Zell Subgruppen entgegenwirken und durch den Transkriptionsfaktor Foxp3 (*Forkhead-Box-P3*) gekennzeichnet sind [106-108]. Die Proliferation von Treg-Zellen wird durch TGF- β und IL-2 getriggert und durch IL-6 und IL-23 gehemmt (*Abb. 1.1.1*) [31]. Ein weiterer proliferationsfördernder Faktor ist der Vitamin-A-Metabolit, Retinsäure, der gleichzeitig die Th-17 Differenzierung hemmt [109-112]. Treg-Zellen produzieren das anti-inflammatorisch wirkende Zytokin IL-10, sowie TGF- β [26, 31]. Mehrere Studien konnten bei aktiver CED eine erniedrigte Frequenz (erniedrigte Zellzahl im peripheren Blut) von Treg-Zellen (mit gleichzeitiger Erhöhung der Zahl von Th17-Zellen) beweisen, die unter erfolgreicher Therapie mit anti-TNF-Antikörpern ansteigt [113-115]. Gleichzeitig wurde bei aktivem MC in der Lamina propria eine erhöhte Expression an Foxp3 und vermehrt Treg-Zellen nachgewiesen [116, 117]. Auch die Apoptoserate Foxp3⁺ Zellen scheint in der aktiven Krankheit in der Mukosa erhöht zu sein, während sie in gesunden Kontrollen im Darm niedriger und im peripheren Blut erhöht ist [118]. Interessant ist, dass bei pädiatrischen Patienten mit MC die Treg-Zahl in der Lamina propria signifikant höher war als bei Erwachsenen mit MC [117].

Damit die T-Effektorzellen aus dem peripheren Blut zum Ort der Entzündung migrieren können, sind spezifische Chemokine und Integrine, sowie entsprechende Rezeptoren nötig. Das epitheliale Chemokin CCL-25 (*CC-Chemokine-Ligand-25*), dessen Rezeptor an den T-Zellen, CCR-9 (*CC-Chemokinereceptor-Type-9*), sowie das Integrin $\alpha 4\beta 7$ und das passende epitheliale Adhäsionsmolekül, MAdCAM-1 (*Mucosal-Cell-Adhesion-Molecule-1*) sind für die Migration von T-Zellen in die Darmmukosa verantwortlich (*Abb. 1.1.1*) [58, 119-121]. Verschiedene Th-Subpopulationen exprimieren charakteristische Chemokinrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Th17-Zellen tragen u.a. den Chemokinrezeptor CCR-6, wobei dies kein surrogater Marker ist [122].

Einleitung

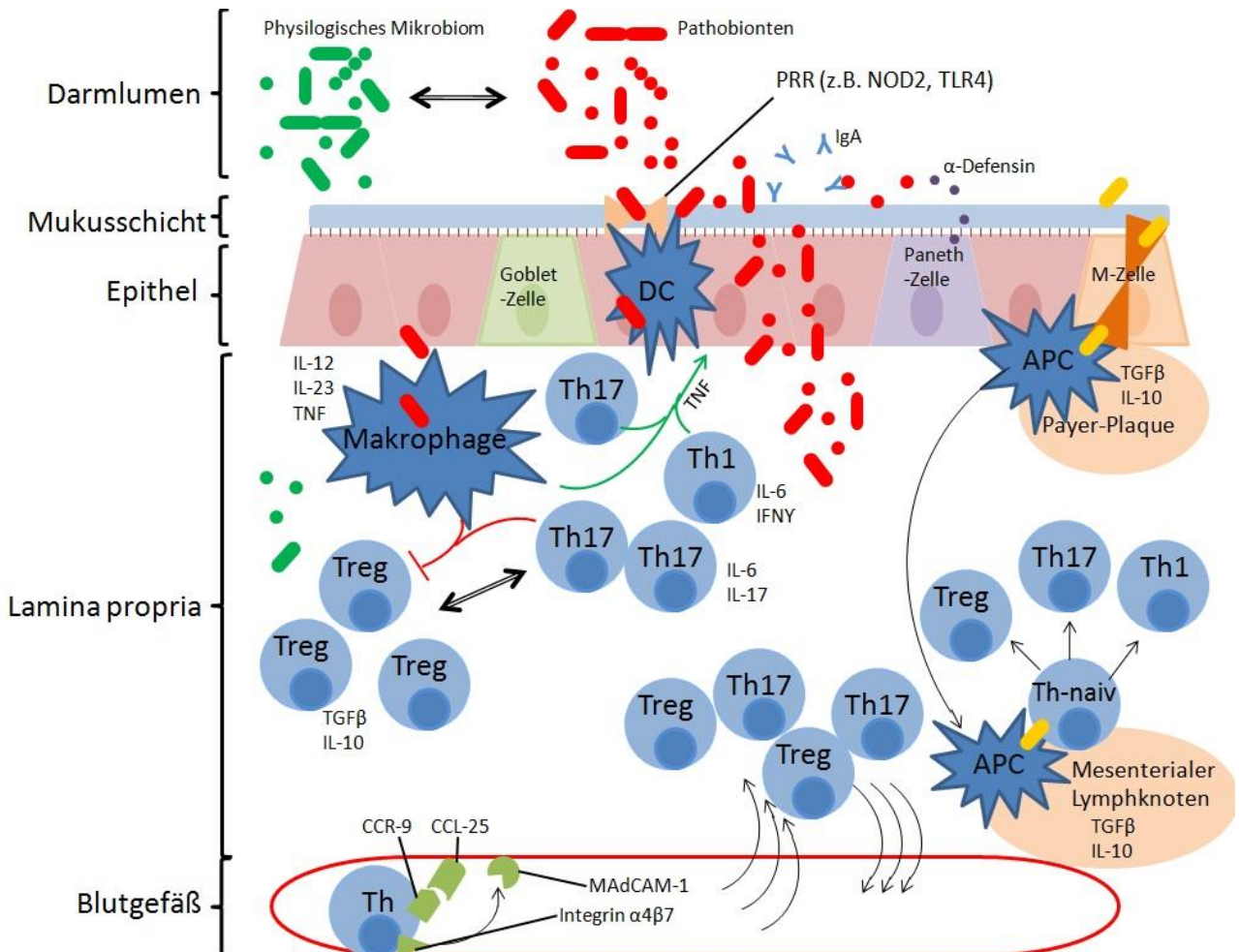


Abbildung 1.1.1 Das intestinale Immunsystem und seine Komponenten

Auf luminaler Ebene konkurrieren potentiell schädliche Mikroorganismen mit dem physiologischen Mikrobiom um Lebensraum. Neben IgA, bilden die von den Paneth-Zellen produzierten α -Defensine und die von Goblet-Zellen gebildete Mukusschicht die erste Barriere. Antigenrezeptoren (PRR), wie z.B. NOD-2 oder TLR-4 erkennen bakterielle Peptidoglykane und initiieren über Signalkaskaden die Abwehr mit Hilfe von dendritischen Zellen (DC). M-Zellen können die Antigene direkt in die anliegenden Peyer-Plaques an Antigenpräsentierenden Zellen (APC) bringen, die sie wiederum zu den mesenterialen Lymphknoten transportieren, wo das Präsentieren an Zellen des adaptischen Immunsystems stattfindet. Gelangen Bakterien (oder andere Antigene) in die Lamina propria, überwiegt entweder die durch Treg-Zellen vermittelte Immuntoleranz oder die Abwehr, z.B. in Form einer Th17 oder Th1-Immunantwort. Treg-Zellen setzen die Zytokine TGF- β und IL-10 frei, Th1-Zellen hauptsächlich TNF, IL-6 und IFN γ , sowie Th17-Zellen hauptsächlich TNF, IL-6 und IL-17. Gleichzeitig sorgen Makrophagen für eine effiziente Abwehr, die die Pathogene phagozytieren können und ebenfalls TNF freisetzen. TNF erhöht die Darmwandpermeabilität und wirkt so pro-inflammatorisch. Aktivierte Makrophagen und Th17-Zellen hemmen die Proliferation von Treg-Zellen (Abb. 1.1.2). Für die Lymphozytenmigration aus dem peripheren Blut in die Lamina propria sind Rezeptoren und Integrine an den Zell- und Gefäßwandoberflächen nötig.

Mehrere Studien des letzten Jahrzehnts haben bewiesen, dass CD4⁺ T-Zellen, insbesondere Treg-Zellen mehrere Transkriptionsfaktoren exprimieren können und es so eine Plastizität zwischen den Subgruppen besteht (Abb. 1.1.2) [123-127]. Zudem zeigen Tiermodelle, dass die Th17-Treg-Balance durch das Darmmikrobiom beeinflusst werden kann und vermuten Bakterienspezies, die die Proliferation der jeweiligen Th-Zell-Subgruppen induzieren könnten

[60, 128, 129]. Beispielsweise induzieren Clostridium Spezies der Cluster IV und XIVa TGF- β -vermittelt Tregs in der Dickdarmmukosa von Mäusen [130].

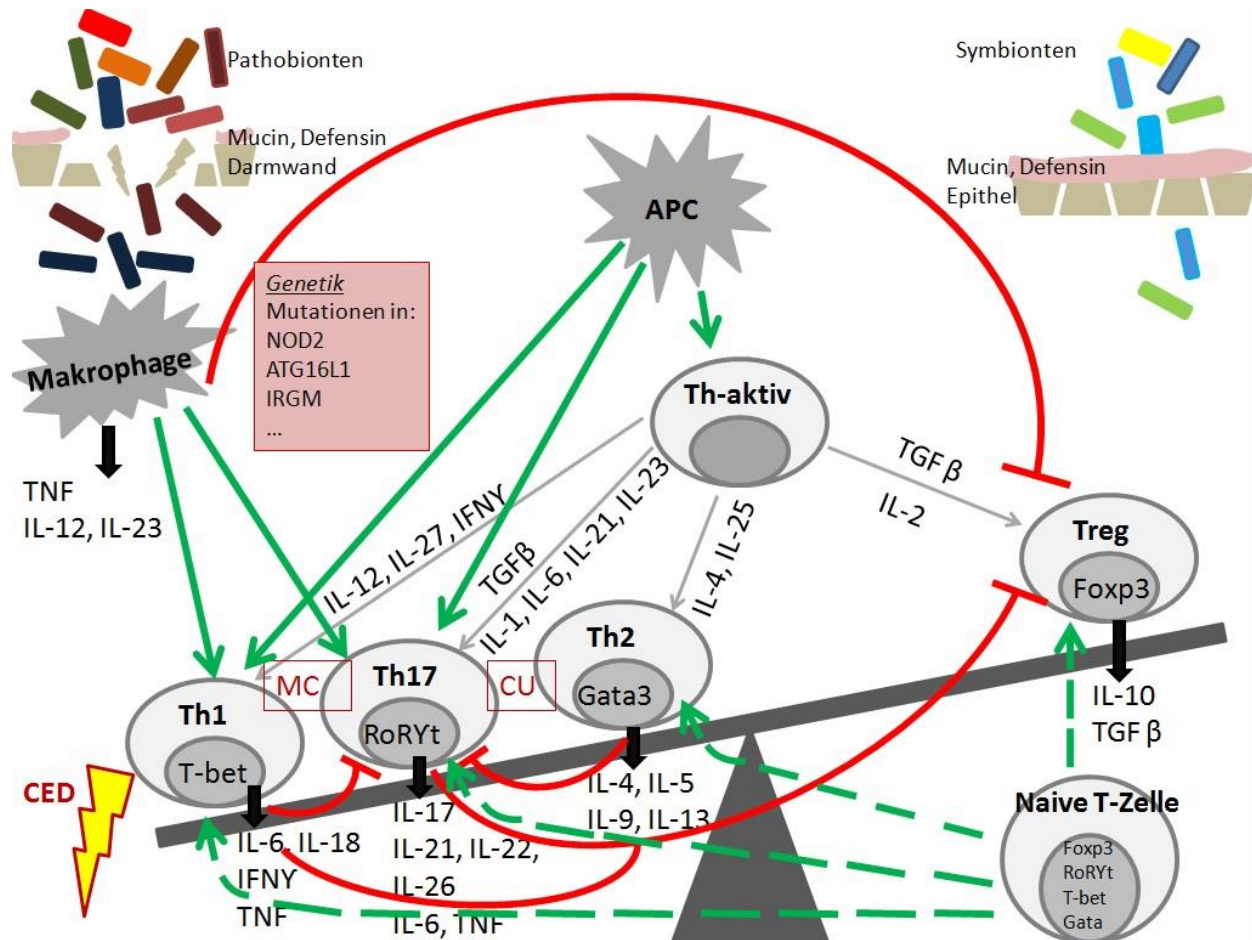


Abbildung 1.1.2. Schematische Darstellung der komplexen Balance zwischen Immunabwehr und Immuntoleranz (modifiziert nach Sanchez-Munoz et al. [131])

Entsteht eine Imbalance zugunsten der pro-inflammatorischen Th17- und Th1-Zellen (bei MC) bzw. Th2-Zellen (bei CU) kommt es zu einer Inflammation. Diese wird durch ein verändertes Mikrobiom, eine durchlässige Darmbarriere, sowie durch Mutationen in krankheitsassoziierten Genen begünstigt. Auf der Waage sind links die pro- und rechts die anti-inflammatorische Zellen und ihre Zytokine dargestellt. Diese proliferieren aus aktivierten Th-Zellen unter Wirkung von entsprechenden Zytokinen (an den grauen Pfeilen). Grüne Pfeile zeigen eine Induktion, rote Pfeile eine Hemmung der Zelldifferenzierung. APC, antigenpräsentierende Zellen; CED, chronisch entzündliche Darmerkrankung; CU, Colitis ulcerosa; MC, Morbus Crohn.

1.2 Therapiemöglichkeiten von pädiatrischem Morbus Crohn

Obwohl bisweilen keine kausale Therapie für MC möglich ist, steht eine hohe Zahl an unterschiedlichen Therapieoptionen zur Verfügung (Tab 1.2.1). Ziel der Therapie ist die Beschwerdefreiheit des Patienten kombiniert mit einem vollständigen endoskopischen und histologischen Ausheilen der Schleimhaut des GITs (*Mucosal Healing, Deep Remission*), um langfristig den Krankheitsverlauf so zu modifizieren, dass Komplikationen vermieden werden und den Patienten eine altersentsprechende, ungestörte körperliche und psychische

Entwicklung ermöglicht wird. Dies setzt gleichzeitig auch die Minimierung von Nebenwirkungen einer CED-Therapie voraus [11, 17]. Aktuelle Behandlungsleitlinien basieren auf den Empfehlungen der *European Crohn's and Colitis Organisation* (ECCO) und der ESPGHAN und setzen die korrekte Klassifikation der CED und die Beurteilung der Krankheitsaktivität voraus [132, 133]. Grundsätzlich ist zwischen einer Induktionstherapie bei akuter Entzündung zur Minderung der Krankheitsaktivität und einer Erhaltungstherapie zur Vermeidung von Rezidiven zu unterscheiden. Hierzu stehen eine breite Palette von klassischen Immunsuppressiva - wie etwa Thiopurinen, Methotrexat (MTX), 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) und Steroide, modernen Biologika, sowie supportive Medikamente (Antibiotika) und chirurgischen Interventionen zur Verfügung. Eine nicht-medikamentöse, jedoch sehr wirksame diätetische Therapiemöglichkeit bietet die exklusive Ernährungstherapie (EET) [14, 132, 133].

1.2.1 Übersicht möglicher Therapiearten bei pädiatrischem MC

Von den Steroiden können Prednisolon und Methylprednisolon „per os“ (p.o.) oder gegebenenfalls auch intravenös (i.v.) zur Induktion über maximal 10 Wochen verabreicht werden. Eine Erhaltungstherapie darf im Anbetracht zahlreicher Nebenwirkungen, wie Osteopenie, Wachstumsretardierung, cushingoide Gesichts- und Körperstatur oder Depression, nicht mit Steroiden erfolgen [11, 14, 132, 133]. Alternativ ist beim isolierten MC-Befall der Ileozökalregion auch eine topische Glukokortikoidtherapie mit Budesonid p.o. möglich, wobei wegen eines hohen First-pass-Effekts mit deutlich weniger – wenngleich nicht vernachlässigbaren – Nebenwirkungen zu rechnen ist [11]. Obwohl eine Induktionstherapie mit Steroiden bei MC eine gute Wirksamkeit aufweist, ist sie wegen den enormen Nebenwirkungen einer EET unterlegen [11, 14, 132, 133]. 5-ASA Produkte (am häufigsten Mesalazin) können sowohl für eine Induktions-, als auch für eine Erhaltungstherapie bei der Crohn-Colitis verwendet werden, wobei eine Wirksamkeit bei MC nur für sehr gering gehalten wird [11].

Thiopurine, wie Azathioprin (AZA) oder 6-Mercaptopurin (6-MP) können nur als Erhaltungstherapie p.o. verabreicht werden, weil mit einem Wirkungseintritt erst nach 10-14 Wochen zu rechnen ist [11]. Nebenwirkungen, wie Pankreatitis, Hepatotoxizität oder Myelosuppression sind möglich [11].

Ebenfalls nur für Erhaltungstherapie geeignet ist MTX, wobei hier *Compliance*-fördernd wirken kann, dass dieses Medikament nur einmal wöchentlich subcutan (s.c.) oder p.o. genommen werden muss. Da MTX ein Folsäureantagonist ist, sollte zur Minderung der Toxizität 24 Stunden nach MTX Gabe, einmalig Folsäure gegeben werden [11]. Eine MTX-

Erhaltungstherapie ist bei MC in Kombination mit Infliximab, einem anti-TNF-Antikörper indiziert, denn hierbei kann zusätzlich eine Hemmung der Immunogenität gegen den therapeutischen Antikörper erzielt werden [11].

In Deutschland sind für die Therapie von pädiatrischer CED anti-TNF-Antikörper, wie Infliximab und Adalimumab (nur MC) ab 6 Jahren zugelassen [11]. *Off-label* wird immer öfter auch ein anti- $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-Antikörper (Vedolizumab) angewendet, der für eine CED-Therapie bisher nur bei Erwachsenen zugelassen ist [134, 135]. Vertretend für alle anti-TNF-Antikörper wird hier, das seit längstem verwendete Medikament, Infliximab, ein chimärer, monoklonaler Antikörper, behandelt. Der Antikörper ist gegen das Zytokin TNF gerichtet und greift somit in der Pathogenese den APC-Th17 Signalweg an und wirkt durch die Neutralisation von pro-inflammatorischem TNF sowie der Elimination von Immunzellen, die transmembranäres TNF exprimieren (siehe Kapitel 1.1.3). Infliximab ist für die Induktions- und auch für die Erhaltungstherapie von MC im Kindesalter ab 6 Jahren zugelassen. Die klassische Indikation besteht als Erhaltungstherapie bei chronisch-aktiven oder fistulierendem MC, wobei nach aktuellen Empfehlungen eine primäre Induktionstherapie bei Hochrisiko-MC-Patienten (tiefe Kolonulzera, langstreckiger oder pan-enterischer Befall, ausgeprägte Wachstumsretardierung oder Osteoporose, Strikturen, Fisteln, sowie schwerer perianaler Befall) ebenfalls mit Infliximab (oder anderen Anti-TNF-Antikörpern) erfolgen soll [132, 133]. Mehrere klinische Studien berichten über erfolgreiche Remissionsinduktion und Remissionserhaltung unter Infliximab [136-140]. Die größte, klinische Untersuchung war die REACH Studie (*A randomized, multicenter, open-label study to evaluate the safety and efficacy of anti-TNF chimeric monoclonal antibody (infliximab, REMICADE®) in pediatric subjects with moderate-to-severe Crohn's disease*) von 2007. Hierbei konnten Hyams et al. in 88,4% der Patienten nach 10 Wochen ein signifikantes Ansprechen und in 58,9% eine Remission beobachten. Nach einem Jahr waren in der Gruppe, die Infliximab alle 8 Wochen bekamen noch 55,8 % in Remission [141]. Ebenfalls wurde über ein Ansprechen auf eine einmalige Infliximab-Gabe nach einem Monat in der Endoskopie berichtet [139]. Vollständiges Ausheilen der Mukosa (*Mucosal Healing*), gemessen durch eine relevante Erhöhung regulatorischer Treg-Zellen im peripheren Blut, wurde nach 10 Wochen in 15 von 66 pädiatrischen MC-Patienten gesehen [142]. Der bei Antikörpern bekannte Wirksamkeitsverlust konnte auch bei Infliximab in Langzeitstudien gezeigt werden, so nach 5 Jahren bereits in 50% der Fälle, weshalb Dosiserhöhungen notwendig wurden [143]. Eine gleichzeitige Therapie mit klassischen Immunsuppressiva (z.B. MTX oder AZA) wirkt diesen Effekt entgegen, geht gleichzeitig jedoch mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Neoplasien einher [144, 145].

Medikamente	Morbus Crohn		Schleimhautheilung?
	Induktionstherapie	Erhaltungstherapie	
5 – ASA (z.B. Mesalazin)	Nur bei milder Crohn-Colitis, wenig wirksam	Nur bei milder Crohn-Colitis, wenig wirksam	sehr geringgradig
Steroide	Ja (wenn EET nicht möglich)	Nein	geringgradig
Exklusive ET	Ja	Nein	mittel- bis hochgradig
Partielle ET	Nein	Ja (in Kombination)	-
Thiopurine	Nein	Ja	-
MTX	Nein	Ja	-
Anti-TNF-Antikörper	Ja	Ja	hochgradig
α 4 β 7-Inhibitor (Zulassung nur für Erwachsene)	Ja	Ja	keine pädiatrischen Daten
Antibiotika (Ciprofloxacin oder Metronidazol)	Bei Komplikationen (Fisteln, Abszesse, etc.)	Nein	nein

Tabelle 1.2.1 Übersicht der Therapiemöglichkeiten für MC im Kindes- und Jugendalter (nach Schwerd et al. [11])

Unter Schleimhautheilung wird die Effektivität der einzelnen Induktionstherapieformen für *Mucosal Healing* bzw. *Deep Remission* dargestellt. Bei partieller Ernährungstherapie (ET) besteht die Ernährung im Gegensatz zur exklusiven ET nicht ausschließlich aus Formulanahrung, sondern diese ersetzt einen Teil der täglichen Nahrung.

5-ASA, 5-Aminosalicylsäure; MTX, Methotrexat

1.2.2 Bedeutung der EET in der Therapie von pädiatrischem MC

Die EET ist laut aktuellen ECCO und ESPGHAN Empfehlungen Induktionstherapie der Wahl bei pädiatrischen Patienten mit luminalen MC [132, 133]. Hierbei handelt es sich um eine ausschließliche Ernährung mit einer Formelnahrung, die über 6-8 Wochen p.o. oder über eine nasogastrale Sonde verabreicht wird. Unter EET darf keine andere Nahrung aufgenommen werden, was sehr belastend für die Patienten ist. Eine partielle Ernährungstherapie (PET) ist als Induktionstherapie nicht geeignet, obwohl sie bei der Erhaltungstherapie zusätzlich gegeben werden kann und scheint hierbei den Remissionserhalt zu begünstigen [146]. Für eine EET sind elementare, semi-elementare oder Oligopeptid-basierte, sowie polymere Nahrungsformeln geeignet [14, 147]. Elementarnahrungen sind streng antigenfrei und enthalten nur Aminosäuren als Eiweißquelle [17]. Aufgrund des Geschmacks müssen sie meist über eine nasogastrale Sonde zugeführt werden. Semi-Elementarnahrungen (Hydrolysatnahrungen) beinhalten hydrolysierte Oligopeptide, während Polymerformeln nicht-gespaltene Proteine enthalten [17]. Letztere sind nicht nur billiger und besser verfügbar, sondern werden auch besser von Patienten toleriert und eine EET ist somit auch p.o. möglich, was das Körperempfinden, vor allem von Jugendlichen deutlich positiv beeinflusst [17]. Unterschiede in der Wirksamkeit sind zwischen den drei Formelnahrungen bisweilen nicht nachgewiesen worden. Besteht jedoch eine Kuhmilchproteinallergie, so werden Nahrungen auf Kuhmilcheiweiß nicht vertragen und ein Wechsel auf eine Elementardiät ist indiziert [11, 17, 148]. Die Menge der Nahrung wird nach Bedarf (Sport, Wachstum) festgesetzt und sollte

nach einer Steigerung schrittweise über etwa drei bis fünf Tage erreicht werden [11]. Im weiteren Verlauf ist ein strenges Gewichtsmonitoring indiziert [11]. Nach 8 Wochen EET wird schrittweise in ca. einer Woche wieder gesunde Normalkost eingeführt [11, 14]. Die meisten Nebenwirkungen der EET sind selten und nicht schwerwiegend, jedoch ist die Compliance von großer Bedeutung für die Effektivität. Einzig bei einem *Refeeding* Syndrom, bei dem es durch plötzliche Erhöhung von Glukoseangebot und Insulinproduktion beim vorher bereits ketogen umgestelltem Stoffwechsel zur lebensbedrohlicher Elektrolytverschiebung mit ausgeprägtem Phosphatabfall kommen kann, ist besondere medizinische Betreuung indiziert. Weitere Nebenwirkungen sind Flatulenzen, Übelkeit, Durchfall oder Bauchschmerzen. Das Verbot jeglicher Nahrung über 8 Wochen kann auch zum Abbruch der Therapie führen, weshalb noch bei der Indikationsstellung ein Miteinbeziehen der Patienten und die freie Entscheidung für eine EET (nach ausführlicher Aufklärung) von essentieller Bedeutung ist und respektiert werden sollte [11, 14, 17, 149]. Die Wirksamkeit der EET wurde in den neunzehnhundertsiebziger Jahren zufällig von Chirurgen entdeckt, die eine deutliche klinische Besserung bei erwachsenen MC Patienten bemerkt haben, die, auf eine Operation wartend, ausschließlich mit Formelnahrung ernährt worden sind [150]. Seither haben zahlreiche Studien die Wirksamkeit erst bei Erwachsenen, dann zunehmend auch in pädiatrischen Kohorten bewiesen [14, 17]. Diese besteht unter anderem in Gewichtszunahme mit Verbesserung des BMI, Abnahme der systemischen und intestinalen Beschwerden, und Erreichen einer klinischen Remission in etwa 80% der Patienten [14, 151, 152]. Damit ist eine EET der Effektivität von systemischen Steroiden gleichwertig.

Die Effektivität der EET bei Kindern und Jugendlichen schien in zwei Metaanalysen, der, einer Glukokortikoidtherapie überlegen [148, 153]. Pigneur et al. haben in einer prospektiv randomisierten klinischen Studie die Remissionsrate und das Ausmaß des Abheilens der Mukosa (*Mucosal Healing*) nach 8 Wochen Induktionstherapie mit Steroiden oder mit EET bei Kindern zwischen 6 und 17 Jahren mit aktivem MC untersucht. Hierbei wurde eine klinische Remission bei 13 von 13 Patienten unter EET und bei 5 von 6 Patienten unter Steroiden erreicht [154]. Ein relevantes Ausmaß an *Mucosal Healing* war jedoch deutlich häufiger (89%) unter EET als unter Steroiden (17%) zu detektieren (*Tab. 1.2.1*) [154]. In einer früheren Studie haben Borrelli et al. ein *Mucosal Healing* in 14 von 19 pädiatrischen Patienten mit MC unter EET beschrieben, während bei einer Steroidtherapie nur in 6 von 18 Patienten [149]. Die Gleichwertigkeit einer Induktionstherapie durch EET gegenüber einer mit Glukokortikoiden, die bessere Rate an *Mucosal Healing* und vor allem das deutlich bessere Nebenwirkungsprofil suggerieren, dass eine EET als Induktionstherapie vor einer Steroidtherapie bei Kindern und Jugendlichen mit MC nach Möglichkeit zu bevorzugen ist [132, 133].

Die Therapie scheint bei Erstdiagnose effektiver zu sein, so konnten Day et al. bei Patienten mit einer lang bestehenden Krankheit lediglich in 58% eine Remission nachweisen, während Knight et al. retrospektiv bei neudiagnostizierten Patienten in 90% eine Remission gefunden haben [155, 156]. Auch eine wiederholt durchgeführte EET ist im Vergleich zur ersten EET weniger effektiv [17]. Zur unterschiedlichen Wirksamkeit in Abhängigkeit von der Krankheitslokalisation gibt es kontroverse Berichte aus diversen Studien. Insgesamt scheint der hohe Therapieeffekt bei Kolon-Befall auch vorhanden zu sein [155-160]. Lediglich bei Kindern mit perianalen Befall, sowie bei anderen Hochrisiko Patienten ist EET als alleinige Induktionstherapie nicht ausreichend [132, 133, 161].

Die genauen Wirkmechanismen der EET sind nicht bekannt. Eine Theorie ist, dass Ernährung (Normalkost) die epitheliale Barrierefunktion beeinträchtigen kann, hierdurch mehr Bakterien in die Lamina propria gelangen und hier zu einer übermäßigen Immunantwort und Inflammation führen können [162]. Auch die verminderte Zufuhr von Pathobionten, die pro-inflammatorische Signalwege triggern, beziehungsweise die Verschiebung der Mikrobiomdiversität zugunsten Bakterien des physiologischen Mikrobioms unter EET könnten eine Erklärung sein [45, 46, 60, 128, 129]. Weitere Hypothesen beschreiben eine Reduktion intestinaler pro-inflammatorischer Vorgänge durch die verminderte Zufuhr von hyperallergener Nahrung oder bestimmten Fetten bei gleichzeitig erhöhter Zufuhr von wichtigen Nahrungsbestandteilen, wie Spurenelemente oder kurzkettigen Fettsäuren wie vor allem n-Butyrat [17, 163, 164].

Klinisch-experimentelle Studien haben unter EET über Abnahme pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β und IFN- γ in der Lamina propria berichtet [165]. Eine systemische Untersuchung der unterschiedlichen Th-Zellen, sowie ihrer Zytokine in der Lamina propria und im peripheren Blut unter EET - wie sie zahlreich unter anti-TNF-Antikörper-Therapien vorhanden sind - ist zum Beginn der vorliegenden Studie nicht existent.

1.3 Fragestellung

Eine exklusiv enterale Ernährungstherapie wurde in vielen klinischen Studien als wirksam bei pädiatrischen Patienten mit MC erwiesen und ist zurzeit Mittel der Wahl zur Induktionstherapie bei Kindern- und Jugendlichen mit MC. Die genauen Wirkungsweisen der EET sind Thema aktueller Forschungen. Systematische Untersuchungen über den Einfluss der EET auf pro-inflammatorische und immunregulatorische Th-Zellen, sowie ihre Zytokine in der Lamina propria und im peripheren Blut sind zum Beginn dieser Studie nicht vorhanden. Wir vermuteten, dass bereits die vollständige Ernährung mit einer Formelnahrung ohne medikamentöse Therapie zum Nachweis der Entzündungsresolution führt.

Ziel vorliegender Studie war es, den Einfluss exklusiv enteraler Ernährungstherapie auf die systemische und mukosale Immunregulation von Morbus Crohn im Kindes- und Jugendalter zu untersuchen.

Als primärer Endpunkt wurde die Bestimmung des Verhältnisses der Treg-Zellen in der Lamina propria zur Frequenz der Treg-Zellen im peripheren Blut als Hinweis auf eine beginnende Ausheilung der Schleimhaut (*Mucosal Healing*) festgelegt. Diese Untersuchung wurde bereits nach 3-4 Wochen durchgeführt, um frühe Veränderungen zu detektieren.

Als sekundärer Endpunkt wird der Einfluss der EET auf weitere Th-Subpopulationen, insbesondere auf Th17 Zellen gesehen. Des Weiteren wurde der Einfluss der EET auf klinische Parameter, wie die Krankheitsaktivität und der Verlauf unterschiedlicher Entzündungswerte, untersucht.

Anhand der Ergebnisse sollen neue Erkenntnisse über die Wirkungsweise der EET gewonnen werden, die in der Zukunft als Hilfe bei der Therapieoptimierung und Bekämpfung der Krankheit sein könnten.

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign und Patientenproben

Das Studiendesign ist in Abbildung 2.1.1 dargestellt und die Ein- bzw. Ausschlusskriterien sind in Tabelle 2.1.1. zusammengefasst. Pädiatrische MC-Patienten mit aktiver Entzündung wurden – nach schriftlicher Aufklärung und Einholen des Einverständnisses der Patienten und ihrer Sorgeberechtigten - auf der gastroenterologischen Station der Dr. von Haunerschen Kinderklinik (Klinikum der Universität München) in die Studie eingeschlossen. Die Patienten waren entweder neudiagnostiziert und damit ohne vorherige Therapie oder sie hatten eine feste medikamentöse Therapie, welche in den vergangenen 3 Monaten nicht geändert wurde. Die Diagnose Morbus Crohn wurde nach den überarbeiteten Porto-Kriterien gestellt [23]. Die Patientenevaluation erfolgte im Rahmen der Erstdiagnose bzw. bei einem akuten Schub (beide Zeitpunkte werden in dieser Arbeit definiert als „vor-EET“) und 3-4 Wochen nach Beginn einer exklusiven Ernährungstherapie (definiert als „EET“). Zu diesen Zeitpunkten wurden folgenden Parameter standardisiert erfasst: Anamnese, körperliche Untersuchung, laborchemische Entzündungswerte und der sog. mathematisch gewichtete pädiatrische Crohn- Aktivitätsindex (wPCDAI, engl. *weighted Paediatric Crohn's Disease Activity Index*) [24]. Vor Therapiebeginn und 3-4 Wochen später wurden jeweils 8-10 ml venöses Blut im Rahmen einer Routine-Blutentnahme entnommen und in heparinisierten Gefäßen aufbewahrt. Die Entnahme des Darmgewebes vor der Ernährungstherapie erfolgte während der zur Diagnosestellung benötigten Koloskopie. Das Entnehmen der Gewebeproben zum zweiten Zeitpunkt setzte eine erneute Endoskopie voraus. Hier wurde eine Sigmoidoskopie durchgeführt, welche keine vollständige Darmvorbereitung notwendig machte. War bei Patienten eine vollständige Koloskopie indiziert, wurden auch Proben oberhalb des Sigmoids entnommen.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU München genehmigt (Projekt-Nr. 411-11) und im Deutschen Register Klinischer Studien (Studien-ID: DRKS00003548, Datum der Registrierung 17.02.2012) registriert. Die Einwilligungserklärung wurde von den Sorgeberechtigten eingeholt und Patienten über 12 Jahren gaben ebenfalls ihr Einverständnis.

Die Ein- und Ausschlusskriterien sind in *Tabelle 2.1.1* und ein Schema des Studiendesigns in *Abbildung 2.1.1* dargestellt.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ol style="list-style-type: none"> 1. Gesicherte Diagnose oder hochgradiger Verdacht auf einen Morbus Crohn 2. Indikation einer Therapie mit EET 3. Alter zwischen 6 und 18 Jahren 4. Einverständnis der Patienten und der Eltern 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Einschlusskriterien nicht erfüllt 2. Veränderung der immunsuppressiven Medikation in den vergangenen 3 Monaten

Tabelle 2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Studie.

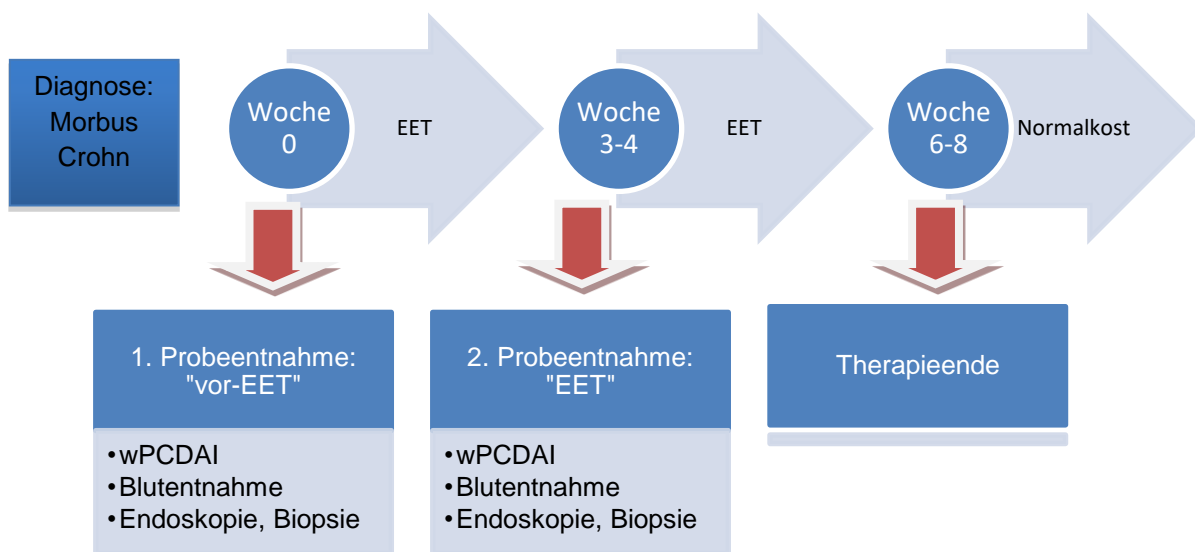


Abbildung 2.1.1 Studiendesign.
wPCDAI, *weighted Pediatric Crohn's Disease Activity Index*

2.2 Exklusive Ernährungstherapie

Die EET bedeutet die ausschließliche Ernährung mit einer Formelnahrung. Es wurden zwei Nahrungen verwendet: Modulen IBD[®] von Nestlé[®], Vevey, die Schweiz und Neocate[®] von Nutricia[®], Erlangen, Deutschland. Die Therapiedauer betrug 6 bis 8 Wochen als Remissionsinduktion. Außer klarem Wasser und Kaugummi war keine andere Nahrung erlaubt. Die Menge der Formulanahrung wurde anhand des individuellen Kalorienbedarfes (Basalrate plus Bedarf für Aufholwachstum) berechnet. Um eine Intoleranz oder ein Refeeding-Syndrom zu vermeiden, wurde die EET bei neudiagnostizierten Patienten im stationären Rahmen initiiert und über 2-3 Tage stufenweise gesteigert. Die Zufuhr erfolgte - je nach Compliance beziehungsweise Wunsch des Patienten - entweder per os oder über eine nasogastrale Magensonde.

Nach Ende der EET wurde Normalkost über ca. 3 Wochen langsam wieder eingeführt, beginnend mit allergenarmer Nahrung. Gleichzeitig wurde die Menge der Formulanahrung stufenweise reduziert.

2.3 Bestimmung der klinischen, laborchemischen und histopathologischen Krankheitsaktivität

2.3.1 Anthropometrische Daten

Anthropometrische Daten wurden als alters- und geschlechtsspezifische Z-Scores, basierend an den WHO-Referenzdaten von 2007 interpretiert. Die Berechnung erfolgte mit der AnthroPlus Software (Version 1.0.4, Genf, die Schweiz).

2.3.2 wPCDAI

Für die Bestimmung der Krankheitsaktivität wurde der mathematisch gewichtete pädiatrische Crohn Aktivitätsindex (wPCDAI) verwendet [24]. Im Vergleich zum Original PCDAI kann der wPCDAI die Krankheitsaktivität besser diskriminieren und ist leichter zu erfassen [24]. Er korreliert signifikant mit dem fäkalen Inflammationsmarker Calprotectin und der Schleimhautentzündung [166]. Die Berechnung erfolgte Anhand Tabelle 2.3.1.

Kriterien	Einteilung	Punkte
Bauchschmerzen	Keine	0
	Milde: keine Aktivitätseinschränkungen	10
	Moderat bis Schwere: Aktivitätseinschränkungen	20
Allgemeinbefinden	Gut, Keine Einschränkungen im Alltag	0
	Gelegentlich Einschränkungen im Alltag	10
	Sehr schlecht, regelmäßige Einschränkungen im Alltag	20
Stuhlhäufigkeit (pro Tag)	(0-)1 flüssiger Stuhl, kein Blut	0
	2-5 flüssige Stühle ohne, oder 1-2 halbfeste Stühle mit Blut	7,5
	Ausgeprägte Blutung oder ≥ 6 flüssige Stühle oder nächtlicher Durchfall	15
BSG	< 20 mm/h	0
	20-50 mm/h	7,5
	> 50 mm/h	15
Albumin	$\geq 3,5$ g/dl	0
	3,1 - 3,4 g/dl	10
	$\leq 3,0$ g/dl	20
Gewicht	Gewichtszunahme oder gewollte Abnahme / Stagnieren	0
	Ungewollte Abnahme (1-9%) / Stagnieren	5
	Abnahme $\geq 10\%$	10
Perirektaler Krankheitsbefall	Keiner	0
	1-2 schmerzlose Fistula	7,5
	Aktive Fistula, Schmerzen, Abszess	15
Extraintestinale Manifestationen	Keine	0
	≥ 1	10
Gesamtpunktzahl		0-125

Tabelle 2.3.1 Bestimmung der Krankheitsaktivität mittels wPCDAI.

Die Punkte werden wie folgt bewertet:

- Remission: $\leq 12,5$ Punkte
- Leichte Aktivität: 12,5 - 40 Punkte
- Moderate Aktivität: 40 - 57,5 Punkte
- Schwere Aktivität: $> 57,5$ Punkte
- Eine Abnahme von 17,5 Punkte wird als klinische Besserung bewertet

2.3.3 Entzündungswerte

Blutbild mit Differenzierung und Laborchemie wurden nach gängigen Standardmethoden im Institut für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München durchgeführt. Es wurden folgenden Parameter bestimmt: Blutbild mit Differenzierung, C-reaktives Protein (CRP), Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), Fibrinogen.

2.3.4 Histopathologische Einteilung des Krankheitsaktivitätsgrades

Um die Diagnose Morbus Crohn histopathologisch zu sichern und den Verlauf zu beurteilen, wurden während der endoskopischen Untersuchung Zangenbiopsien entnommen und im Institut für Pathologie der LMU München beurteilt (in der Regel Hämatoxylin-Eosin Färbungen). Diese histopathologische Begutachtung wurde herangezogen, um den Grad der mukosalen Entzündung zu bestimmen. Dazu wurde ein Score von *Reikvam et al.* und *Rugtveit et al.* leicht modifiziert verwendet [117, 167]. Die leichte Modifikation besteht lediglich in der Beurteilung der Goblet-Zellen, die für den histopathologischen Score vorliegender Arbeit nicht explizit beurteilt wurden.

Der histopathologische Krankheitsaktivitätsscore wird wie folgt beurteilt:

- 0 = lichtmikroskopisch gesunde Mukosa;
- 1 = keine Zeichen aktiver Entzündung aber unregelmäßige und/oder rarefizierte Kryptenarchitektur, mukosale Atrophie;
- 2 = gering-floride Colitis, Kryptenabszesse, strukturelle Veränderungen;
- 3 = wie 2 aber mäßig-floride Colitis und zusätzliche oberflächliche Erosionen;
- 4 = wie 3 aber hoch-floride Colitis mit ulzerativen Epitheldestruktionen.

Die Einstufung erfolgte verblindet, d.h. die histopathologischen Berichte wurden ohne Zuordnung zum Patienten und Entnahmedatum eingestuft, und die bestimmte Krankheitsaktivitätsgrade nachträglich den Proben zugeordnet. Da eine Probeentnahme von der exakt gleichen Stelle vor- und unter EET im Rahmen der endoskopischen Diagnostik nicht

möglich war, wurden neben dem Vergleich der Krankheitsaktivität der jeweils korrelierenden Biopsien, auch gemittelte Werte aller Biopsien eines Patienten vor- und unter EET verglichen.

2.4 Geräte und Reagenzien

2.4.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Sterile Werkbank	LaminAir HB2472	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge	5415D	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Konfokalmikroskop	FV1000	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Schüttler	T10 Basic	IKA (Staufen, Deutschland)
Eismaschine	-	Ziegra (Isernhagen, Deutschland)
Inkubator	Hera cell 240	Thermo Fischer Scientific (Langensebold, Deutschland)
Mikroskop	Axioskop	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
pH-Meter	PHM 82 standard	Radiometer (Kopenhagen, Dänemark)
Pipetten	Eppendorf professional	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Präzisionswaage	Scale 440-47N	Kern und Sohn GmbH (Deutschland)
Durchflusszytometer	FACS Canto II (DIVA software)	BD biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
Dampfgarer	Braun Multi Gourmet FS 20®	Braun GmbH (Kronberg, Deutschland)

Tabelle 2.4.1 Geräte

2.4.2 Reagenzien der Durchflusszytometrie

Humanes Antigen	Antikörper	Klon	Konjugat	Verdünnung	Firma
CD3	Monoklonal, Maus	UCHT1	FITC	1:80	eBioscience
CD4	Monoklonal, Maus	SK3	APC-H7	1:50	BD biosciences
CD25	Monoklonal, Maus	2A3	APC	1:80	BD biosciences
CCR6	Monoklonal, Maus	11A9	PE-Cy7	1:50	BD biosciences
CRTH2	Monoklonal, Ratte	BM16	PerCp-Cy5.5	1:12,5	BD biosciences
α 4/CD49d	Monoklonal, Maus	9F10	FITC	1:25	BD biosciences
Integrin β 7	Monoklonal, Ratte	FIB504	APC	1:20	BD biosciences
Foxp3	Monoklonal, Ratte	PCH101	PE	1:40	eBioscience

Tabelle 2.4.2 Antikörper für Durchflusszytometrie.

eBioscience, San Diego, USA; BD biosciences, Franklin Lakes, USA

2.4.3 Reagenzien der Immunfluoreszenzhistochemie

Humanes Antigen	Antikörper	Klon	Verdünnung	Firma
CD3	Polyklonal, Hase	-	1:100	Dako
CD3	Monoklonal, Maus	F7.2.38	1:100	Dako
CD4	Monoklonal, Maus	4B12	1:100	Dako
CD20	Monoklonal, Hase	EP459Y	1:200	Abcam
IL-17	Polyklonal, Ziege	-	1:30	R&D Systems
IL-17	Polyklonal, Ziege	C20	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Foxp3	Monoklonal, Ratte	PCH101	1:50	eBioscience
IFN gamma	Polyklonal, Hase	-	1:100	Abcam
CD68	Monoklonal, Maus	-	1:100	Dako
Ki-67	Monoklonal, Maus	MIB-1	1:50	Dako
RORgammaT	Monoklonal, Ratte	AFKJS-9	1:25	eBioscience

Tabelle 2.4.3.1 Primäre Antikörper.

Dako, Glostrup, DK; Abcam, Cambridge, USA; R&D Systems, Minneapolis, USA; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA; eBioscience, San Diego, USA

Material und Methoden

Antigen/Spezies	Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Firma
IgG/Maus	Polyklonal, Esel	HRP	1:100	Abcam
IgG/Hase	Polyklonal, Esel	HRP	1:100	Jackson Immuno Research
FITC	Monoklonal, Maus	HRP	1:100	Merck Millipore
IgG/Ziege	Polymer, Pferd	Peroxidase Mikropolymer	Ready to Use	Vector Laboratories
IgG/Ratte	Polymer, Ziege	Peroxidase Polymer	Ready to Use	Nichirei Biosciences INC.

Tabelle 2.4.3.2 Sekundäre Antikörper.

Abcam, Cambridge, USA; Jackson Immuno Research, West Grove, USA; Merck Millipore, Billerica, USA; Vector Laboratories, Burlingame, USA; Nichirei Biosciences INC., Tokyo, JP

Substrat	Visualisierungs-System	Exzitatorische Wellenlänge (max)	Emmisionswellenlänge(max)	Firma
DAB	<i>Liquid DAB+ Substrate Chromogen System</i>	-	-	Dako
DAPI	<i>In Vectashield® Mounting Medium</i>	360nm	460nm	Vector Laboratories
<i>Tyramid-Cy3</i>	<i>TSA™Cyanine 3 System</i>	550nm	570nm	PerkinElmer
<i>Tyramid-Cy5</i>	<i>TSA™Cyanine 5 System</i>	649nm	670nm	PerkinElmer
<i>Tyramid-FITC</i>	<i>TSA™Fluorescein System</i>	490nm	525nm	PerkinElmer

Tabelle 2.4.3.3 Farbstoffe.

Dako, Glostrup, DK; Vector Laboratories, Burlingame, USA; PerkinElmer, Waltham, USA

2.4.4 Reagenzien zum Umgang mit Immunhistochemischen Proben

Reagenz	Hersteller
ApopTag®	Millipore
Aqua Bidestillata	H. Kerndl GmbH
Dako Target Retrieval Solution, pH9 (10X)	Dako
DMSO (99,9%)	Sigma-Aldrich
Donkey serum (Eselserum)	Sigma-Aldrich
DPX Mountant for histology	Sigma-Aldrich
Ethanol ≥ 99,5%, vergällt	Carl Roth
Ethanol 96%, vergällt	Carl Roth
FOXP3 staining KIT	eBioscience
Goat serum (Ziegenserum)	Sigma-Aldrich
Histoclear Histological Cleaning Agent	National Diagnostics
Hydrogen peroxidesolution 30wt% in H ₂ O	Sigma-Aldrich
NaOH ≥ 98%	Carl Roth GmbH
Natrium-Azid ≥ 99%	Carl Roth GmbH
Salzsäurerauchend 37%	Carl Roth GmbH
Tween 20	Sigma-Aldrich
Vectashield® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	Vector Laboratories

Tabelle 2.4.4. Reagenzien für Immunhistochemie

Millipore, Burlington, Massachusetts, USA; H. Kerndl GmbH, Weissenfeld, Deutschland; Dako, Glostrup, DK; Sigma-Aldrich, St. Louis/Steinheim, USA/Deutschland; Carl Roth GmbH, Weissenfeld, Deutschland; eBioscience, San Diego, USA; National Diagnostics, Atlanta, USA; Vector Laboratories, Burlingame, USA.

2.5 Isolation von mononukleären Zellen (PBMCs) aus dem peripheren Blut

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten), sogenannte PBMCs (*Peripher Blood Mononucleic Cells*), aus

dem peripheren Blut, isoliert. Die Isolation basierte auf der Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll-Paque-Lösung (GE Healthcare), welche die flüssigen und festen Bestandteile des Blutes in verschiedene Phasen auftrennt. Hierfür wurde Blut in Natrium-Heparin Röhren abgenommen und innerhalb von 4 Stunden mit PBS-Puffer im Verhältnis 2:1 verdünnt. Anschließend wurde das verdünnte Blut auf Ficoll-Separationsmedium in einem Leukosep-Röhren (Greiner) geschichtet. Die Leukosep-Röhren wurden für 30 Minuten mit 1400 RCF (*Relative Centrifugal Force*) und ohne Bremse zentrifugiert. Dadurch reichern sich die gewünschten PBMCs in einem Ring im Überstand (*Buffy Coat*) an und konnten dort abgenommen werden. Nach Überführung in ein Laborgefäß (15 ml Blue-Cap) wurden die PBMCs zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, mit Trypanblau gezählt und auf Vitalität überprüft. Direkt im Anschluss wurde mit der FACS-Oberflächenfärbung begonnen und dafür die PBMCs in PBS-Puffer mit 5% fötalem Kälberserum (FACS-Puffer) auf Eis aufbewahrt.

2.6 Durchflusszytometrie

2.6.1 Allgemeine Funktionsprinzipien

Um die Lymphozyten aus dem peripheren Blut zu charakterisieren und die Verteilung der Lymphozytenpopulationen zu bestimmen, wurde die Methode der Durchflusszytometrie mittels eines *Fluorescence-Activated Cell Sorters* (FACS) angewendet. Hierbei werden die Zellen mit spezifischen Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dies kann entweder direkt (Fluoreszenzfarbstoffen an dem primären Antikörper gebunden) oder indirekt (Fluoreszenzfarbstoff an dem sekundären Antikörper gebunden) erfolgen. Anschließend werden die Zellen in einem FACS-Gerät in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln durch einen Laserstrahl geführt. Je nach Größe, Form, Oberfläche und intrazelluläre Granularität wird das Licht im unterschiedlichen Ausmaß gestreut und von zwei, zueinander rechtwinklig angebrachten Linsen gesammelt und photometrisch detektiert. So beeinflusst die Zellgröße hauptsächlich die Detektion der in der Verlaufsrichtung des Laserstrahls gelegenen Linse (sog. Vorwärtsstreulicht). Die intrazelluläre Granularität dagegen wirkt vor allem auf das Seitwärtsstreulicht, das an den zweiten Detektor trifft. Diese Aufteilung ermöglicht eine Vorselektion der Zellpopulationen, die dann auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch den Laserstrahl angeregt (Exzitation) und senden daraufhin selbst Licht mit niedrigerer Frequenz aus (Emission). Dieses Licht gelangt durch Filter und teildurchlässigen Spiegel zu unterschiedlichen Detektoren. Somit ist eine Mehrfachfärbung möglich, da die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe getrennt ausgewertet werden können. Von der Fluoreszenzintensität kann direkt auf die Anzahl der mit dem entsprechenden Antikörper markierten Zellen geschlossen werden. Die Überlappung der Chromophore (für Genaueres siehe auch Kapitel 2.7.11) wird durch die

Kompensation korrigiert, bei der von jedem detektierten Signal der Anteil abgezogen wird, der durch die Überlappung entstanden ist. Dazu werden für jeden Versuch Kontrollproben einzeln gefärbt, während die anderen Fluoreszenzfarbstoffe an Isotypen-Antikörper gebunden als Negativkontrolle dienen. Dies ermöglicht die genaue Quantifizierung einer Überlappung und somit die Kompensation.

2.6.2 Bestimmung von Oberflächenmolekülen

Die Färbung der, aus dem peripheren Blut isolierten, mononukleären Zellen auf die Oberflächenmoleküle CD3, CD4, CD25, CCR6, CD49d (Integrin α 4) und Integrin β 7 erfolgte nach folgendem Protokoll: Für jede Färbung wurden 1×10^6 PBMCs mit FACS-Puffer in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gewaschen und das Pelletin 100 μ l mit dem Antikörper-Mix resuspendiert. Die Färbung wurde für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert und anschließend mit FACS-Puffer zweimal gewaschen. Im Anschluss erfolgte die intrazelluläre Färbung von Foxp3 (siehe 2.6.3). Die Verdünnungen der Antikörper für die Oberflächenfärbung wurden in Vorversuchen bestimmt.

2.6.3 Bestimmung des intrazellulären Transkriptionsfaktors Foxp3

Nach Färbung der Oberflächenmoleküle wurde der intrazelluläre Transkriptionsfaktors Foxp3 nach dem Protokoll des Foxp3 staining Kit (eBioscience) detektiert. Dies erforderte eine Permeabilisierung der Zellmembran. Um die bereits erfolgte Färbung zu erhalten, mussten die Zellen vor Zerstörung der Zelloberfläche fixiert werden. Beide Vorgänge wurden in einem Schritt mit der Fixation/Permeabilisationspuffer erzielt. Die Zellen aus 2.6.2 wurden in 1 ml Foxp3 Fixation/Permeabilisationspuffer aufgenommen und bei 4°C für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend zweimal mit Permeabilisationspuffer gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 μ l Permeabilisationspuffer resuspendiert, durch Zugabe von 2 μ l Rattenserum unspezifische Antikörperbindung für 15 Minuten geblockt und der anti-Foxp3 Antikörper direkt zugegeben. Nach 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut zweimal mit Permeabilisationspuffer gewaschen und die Zellen am FACS Gerät analysiert.

Die gefärbten Zellen wurden mit einem FACS Canto II™ aquiriert, welches mit der DIVA Software betrieben wurde (Firma BD Biosciences®). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software FlowJo (Tree Star, www.flowjo.com).

Im Folgenden wird exemplarisch die Gating-Strategie für regulatorische T-Zellen dargestellt: Identifikation von Lymphozyten im Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht und anschließende Definition von CD3⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten in der Zweiparameterdarstellung (Dot Plot oder Punktwolkendarstellung). Darstellung der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen anhand der Expression von CD25 und Foxp3 in einem weiteren Dot Plot mit Gating auf CD25^{high}Foxp3⁺

regulatorischen T-Zellen. Gut-homing Th-Zellen wurde anhand der Expression von $\alpha 4$ und $\beta 7$ bestimmt. Dazu wurden $CD4^+$ Th-Zellen im Dot Plot auf $\alpha 4^+$ und $\beta 7^{\text{high}}$ gated [182].

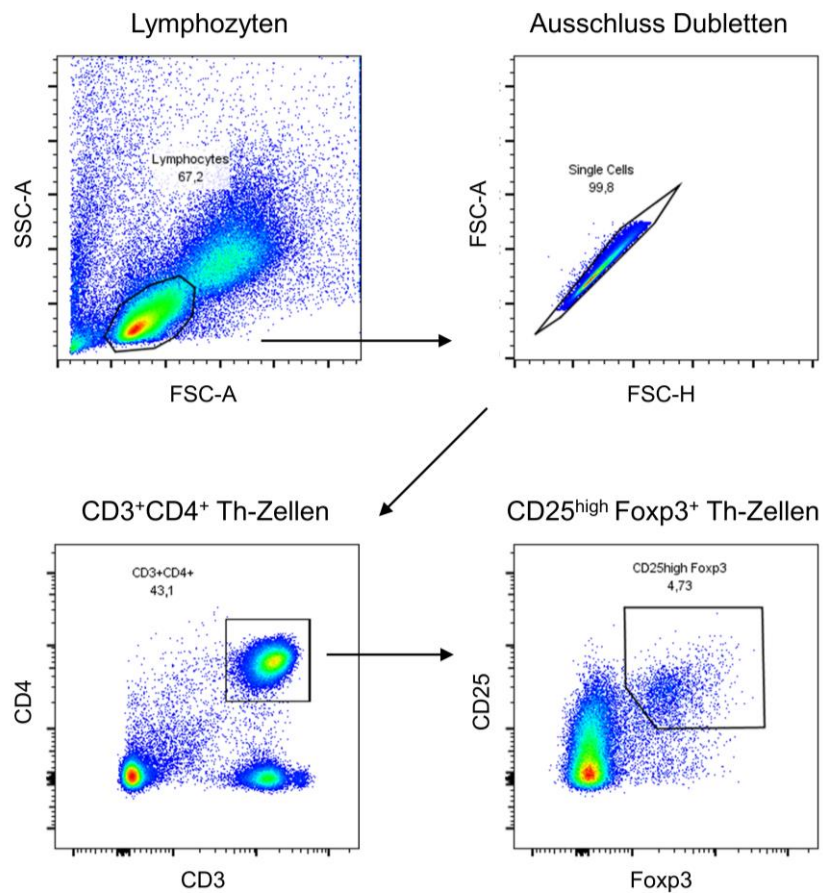


Abbildung 2.1.1 Gating Strategie.

Repräsentative Darstellung der FACS-Gating-Strategie mit Identifikation der Lymphozyten in Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, sowie folgende Definition von $CD3^+CD4^+$ bzw weiter von $CD25^{\text{high}}FOXP3^+$ Th-Zellen in Dot Plots.

SSC-A, *side scatter-area* (im Seitwärtsstreulicht gemessene Pulsfläche, gerechnet als Integral des Lichtsignals); *FSC-A*, *forward scatter-area* (im Vorwärtsstreulicht gemessene Pulsfläche) *FSC-H*, *forward scatter-height* (im Vorwärtsstreulicht gemessene Pulshöhe, das höchste Lichtsignal während des Vorbeifließens einer Zelle am Laser)

2.7 Immunfluoreszenzhistochemische Methoden

2.7.1 Entparaffinisierung und Rehydrierung Paraffineingebetteter Gewebe

Die Mitarbeiter des Pathologischen Instituts der LMU München haben die, während der Koloskopie entnommene, Biopsien in Paraffin eingebettet, auf 4 µm Dicke geschnitten und auf Adhäsionsobjektträger (Superfrost®, Carl Roth GmbH, Weissenfeld, Deutschland) aufgebracht. In diesem Zustand wurden die Schnitte bei Raumtemperatur aufbewahrt. Diese Proben mussten vor der immunhistochemischen Färbung entparaffiniert und anschließend rehydriert werden. Um das Paraffin aufzulösen, wurden die Schnitte zweimal für jeweils 10 Minuten in die *Histoclear* Lösung eingebracht. Es folgte eine schrittweise Rehydrierung der Proben durch eine Reihe von unterschiedlich konzentrierten Ethanol-Lösungen: zweimal 3 Minuten in 100%, jeweils 2 Minuten in 95%, 80% und 70% Ethanol. Eine abschließende Rehydrierung wurde durch Eintauchen in destilliertes Wasser für zweimal 2 Minuten erreicht.

2.7.2 Antigendemaskierung

Durch das Einbetten in Paraffin kommt es während der Fixation unter anderem zur Ausbildung von Methylenbrückenbindungen. Diese führen zu einer Maskierung der Antigene, die so von dem primären Antikörper nicht erkannt werden. Diese Quervernetzungen der Antigene können durch Kochen in einer Retrieval-Lösung teilweise wieder gelöst werden und das Antigen wird so wieder sichtbar. In dieser Arbeit wurden die Gewebeschnitte in einer speziellen Antigen-Retrieval Lösung (Antigen Retrieval Solution, pH 9, Dako) für 25-30 Minuten bei 85-96 °C gekocht. Eine konstante Temperatur wurde mit Hilfe des *Braun Multi Gourmet FS 20®* Dampfgarers erreicht. In diesem wurde die Antigen Retrieval Lösung in einem Aluminiumbehälter eine halbe Stunde lang vorgeheizt, um die Mindesttemperatur von 85 °C zu sichern. Nach dem Kochen wurden die Proben bei Raumtemperatur ausgekühlt und anschließend in PBS-Puffer mit Tween 0,02% gewaschen.

2.7.3 Blocken der endogenen Peroxidase-Aktivität

Die verwendeten sekundären Antikörper waren alle mit dem Enzym HRP (*Horse Radish Peroxidase*) konjugiert, welche in einer Redox-Reaktion den Fluoreszenzfarbstoff umsetzen. Um eine unspezifische Bildung von Farbstoff durch endogene Peroxidasen im Gewebe zu reduzieren, wurden diese zerstört. Dies erfolgte durch Aufbringen von 0,05% (bzw. 1% bei der RORyt Färbung) Natriumazid-Lösung für 15 Minuten, gefolgt von 3% (bzw. 1% bei der RORyt Färbung) H₂O₂ Lösung für dreimal 7 Minuten. Zwischen diesen Schritten wurde mit PBS/Tween 0,02% gewaschen.

2.7.4 Blocken unspezifischer Epitope

Um eine möglichst hintergrundfreie Färbung zu erhalten, wurden unspezifische Bindungsstellen des Gewebes mit Serumproteinen blockiert. Das Serum wurde nach der Spezies des Sekundärantikörpers gewählt und in einer 5% Lösung in PBS-Puffer für 25 Minuten aufgebracht. Nach dem Blocken folgte ein zweimaliges Waschen in PBS/Tween-Lösung für jeweils 3 Minuten.

2.7.5 Markieren mit dem primären und sekundären Antikörper

Der Primärantikörper wurde in PBS verdünnt. Die ideale Verdünnung variierte zwischen den verschiedenen Antikörpern (siehe *Tab.2.4.3.1*) und kann je nach Färbeprotokoll deutlich von der Herstellerempfehlung abweichen. Die optimale Verdünnung wurde in Titrationsfärbungen bestimmt. Die Gewebeschnitte wurden in dieser Antikörperlösung für mindestens 40 Minuten inkubiert. Die Idealbedingungen hinsichtlich Zeit und Temperatur der Inkubation für jeden primären Antikörper mussten ebenfalls durch Probefärbungen bestimmt werden (siehe *Tab.2.7.5.1*). Nachher wurden die Proben gründlich gewaschen in PBS/Tween-Lösung (drei- bis fünfmal für jeweils 3-5 Minuten). Der entsprechende Sekundärantikörper wurde in allen Fällen für eine maximale Dauer von 30 Minuten bei Raumtemperatur auf die Proben aufgebracht. Im Gegensatz zur Inkubation mit dem primären Antikörper, bei der sich unter den idealen Inkubationsbedingungen nach einer Mindestzeit ein Gleichgewicht einstellt, gilt es bei der Inkubation mit dem sekundären Antikörper die Inkubationszeit nicht zu überschreiten, da sich so vermehrt unspezifische Bindungen bilden können. Dies würde in einem hohen unspezifischen Hintergrund resultieren. Wiederum folgte gründliches Waschen in PBS/Tween-Lösung. Die Waschvorgänge waren für eine erfolgreiche Färbung von entscheidender Bedeutung. Daher wurde auf eine ausreichende Dauer und auf ein hohes Volumen von Waschpuffer geachtet.

Inkubationszeit / Temperatur	4 °C	Raumtemperatur
Mindestens 40 Minuten		CD3*; CD3(F7.2.38) *; CD20; CD68; IL-17; IL-17(C20); FOXP3
Mindestens 60 Minuten		RORyt
Über Nacht (12-16 h)	CD3*; CD3(F7.2.38) *; CD4; Ki-67; IFN-γ	

Tabelle 2.7.5.1 Ideale Inkubationszeiten und Temperaturen für die verwendeten primären Antikörper.
**Die besonders stabilen und gut funktionierenden anti-CD3 Antikörper zeigen unter verschiedenen Bedingungen beinahe identische Färbungen*

2.7.6 Signalamplifikation mit Fluoreszenzfarbstoffen

Für die Fluoreszenzfärbung wurde das TSA-System™ (*Tyramide Signal Amplification*) von PerkinElmer® verwendet. Die Effizienz dieses Systems besteht in einer schnellen Aktivierung des mit dem Farbstoff-gekoppelten Tyramids durch das *Horse Radish Peroxidase*-Enzym (HRP), welches wiederum an den Sekundärantikörper konjugiert ist. Die dabei entstehenden hoch-reaktiven und kurzlebigen Tyramid-Radikale binden unmittelbar an der Stelle der HRP-Reaktion an Tyrosinresten im Gewebe. Eine Doppelfärbung wird erreicht indem verschiedene Tyramid-gekoppelte Farbstoffe (wie z.B. FITC und Cyanine 3) in aufeinander folgenden Reaktionen verwendet werden (siehe *Tab.2.4.3.3* und *Kap.2.7.11*). Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit jeweils 150 µl DMSO rekonstituiert. Aus diesen Farbstoffvorräten wurden dann in den benötigten Mengen 1:300 Verdünnungen in *Amplification Diluent* Lösung hergestellt. Weil der Farbstoff FITC besonders starke Färbungen zeigte, wurde dieser in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt. Anschließend wurde in PBS/Tween-Lösung gewaschen.

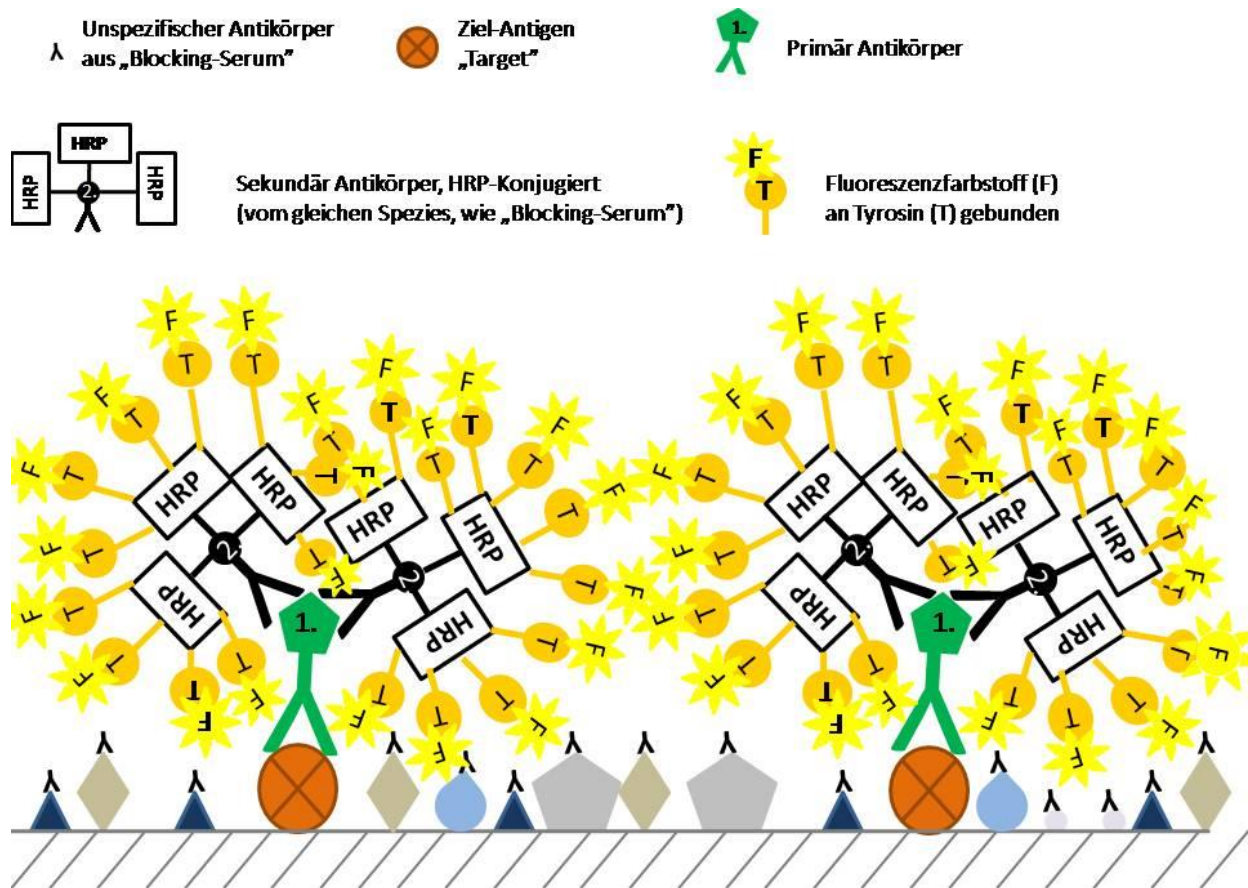


Abbildung 2.7.6.1 Schematische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung.

Unspezifische Antigene werden durch das Aufbringen vom Tiereserum (z.B. Ziege) geblockt. Der primäre Antikörper bindet an das Ziel-Antigen (z.B. CD3). Der sekundäre Antikörper ist mit HRP-Enzym konjugiert und bindet an den primären Antikörper. Nach Aktivierung des Tyramid-Farbstoff-Konjugats durch HRP wird das aktivierte Tyramid-Derivat kovalent im Gewebe deponiert. Da an einen primären Antikörper mehrere Sekundäre binden können, die wiederum zahlreiche Tyrosin-Fluoreszenzfarbstoff-Komplexe aktivieren, entsteht eine Signalamplifikation.

2.7.7 Kernfärbung und Fertigstellen der Proben

Als Eindeckmedium wurde ein Tropfen VECTASHIELD® Medium von Vector Laboratories verwendet, in dem der Zellkernfarbstoff DAPI aufgelöst ist. Die Proben wurden dann mit einem Deckglas (*Slidecover*) bedeckt. Dies wurde mit Nagellack auf dem Objektträger fixiert. Nach einer Trocknungszeit von mindestens 30 Minuten konnte mikroskopiert werden.

2.7.8 Besonderheiten bei Mehrfachfärbungen

Bei Doppel- oder Dreifachfärbungen wurde nach der ersten, beziehungsweise zweiten Färbung, mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, die Schritte ab dem Schritt „Blocken mit Serum“ (siehe Kap.2.7.4) erneut wiederholt. Nach Abschluss aller Färbungen, erfolgte die Kernfärbung. Es war möglich bei einigen gut etablierten primären Antikörper, die Inkubationszeiten zu variieren (z.B. entweder 40 Minuten bei Raumtemperatur oder Übernacht bei 4°C), um ein sinnvolles Zeitmanagement zu erreichen (siehe Tab.2.7.5.1).

2.7.9 TUNEL Assay

Bei zusätzlicher Färbung mit einer Tunnel Assay (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling*) werden apoptotische Zellkerne markiert, indem die 3'-OH-Gruppen an den Bruchenden mit markierten Nukleotiden versehen werden. Bei dieser Methode erfolgte nach der ersten Färbung ein Blocken wie üblicher Weise mit H₂O₂ und Natriumazid. Zudem wurden die Antigene mittels Proteinase (Dako) freigelegt. Anschließend wurden die Proben mit ApopTag® Equilibrierungs-Puffer für 5 Minuten, dann mit TdT-Enzym-Lösung für eine Stunde bei 38°C inkubiert und mit ApopTag® Stop/Wash-Puffer die Reaktion beendet. Die restlichen Schritte entsprechen den der üblichen Immunfluoreszenzfärbung.

2.7.10 Signalamplifikation und letzte Schritte für übliche Immunhistochemie

Gewöhnliche immunhistochemische Färbungen wurden bei der Etablierung verschiedener Antikörper gemacht. Hier erfolgte die Signalamplifikation mittels des DAB⁺ Chromogens. Dieser wurde für 3 Minuten auf die Proben gebracht. Die Proben wurden dann 10 Minuten lang fließend gewässert und eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin erfolgte. Nach ausreichendem Waschen musste den Proben das Wasser entzogen werden. Dafür wurden sie in aufsteigender Reihenfolge in Alkohollösungen der gleichen Konzentrationen wie unter 2.7.1 beschrieben und in die *Histoclear* Lösung eingetaucht. Anschließend wurde als Eindeckmedium DPX *Mountant for Histology* (Sigma-Aldrich®) verwendet.

2.7.11 Fotografie und Bildanalyse

Um einige Zelltypen näher eingrenzen zu können oder eine Aussage über den Anteil spezifischer T-Zellen unter allen T-Zellen zu treffen war es nötig die Präparate mehrfach zu färben. Die Detektion solcher Mehrfachfärbungen sollte eine möglichst genaue Differenzierung zwischen den nur mit einem der verschiedenen Antikörper markierten, den mehrfach markierten und den nicht markierten Zellen, und zusätzlich den durch unspezifische Bindungen markierten Zellen (*Background*) ermöglichen. Mit Immunfluoreszenz-behandelte Präparate können im Gegensatz zu gewöhnlichen immunhistochemischen Proben nicht im herkömmlichen Lichtmikroskop detektiert werden, sondern benötigen fluoreszenzmikroskopische Methoden. Während der Etablierung einer einheitlichen und praktischen Fluoreszenzmikroskopie mit bestmöglicher Qualität und Auflösung, um eine präzise Zellauszählung zu gewährleisten, sind wir auf mehreren Problemen gestoßen. Die Aufnahmen mit dem etwas einfacheren und mehr zugänglichen Fluoreszenzmikroskop zeigten relativ viele, vom Fokus aus in tieferen oder höheren Schichten gelegenen gefärbten Zellen. Wurde es versucht diese Schichten mittels Signalfilterung auszublenden, erfolgte dies auf Kosten der Gesamtqualität. Dieses Phänomen hat die Auszählung der Zellen deutlich

erschwert, weshalb die Fokusebene unbedingt verschmälert werden sollte. Dies gelang durch die Etablierung einer Methode am komplizierteren Konfokalen Mikroskop, bei dem optische Schnittbilder aus der Fokusebene erzeugt werden. Solche extrem dünn angeschnittenen Bilder werden hauptsächlich durch zwei Mechanismen erreicht. Zum einen wird bei der konfokalen Mikroskopie im Gegensatz zur gewöhnlichen Lichtmikroskopie nicht das Gesamtpräparat beleuchtet, sondern es werden Bruchteile zu vielen Zeitpunkten detektiert und durch einen Computer zu einem Gesamtbild gerechnet. Zum anderen lässt eine Lochblende (*Pinhole*) nur Licht aus der Fokusebene durch. Wird das *Pinhole* größer gestellt, wird eine dickere Schicht und so mehrere Zellen abgebildet. Bleibt es jedoch klein, ist eine scharfe Aufnahme gleich dünn angeschnittener Zellen möglich (siehe *Abb. 2.7.11.1*).

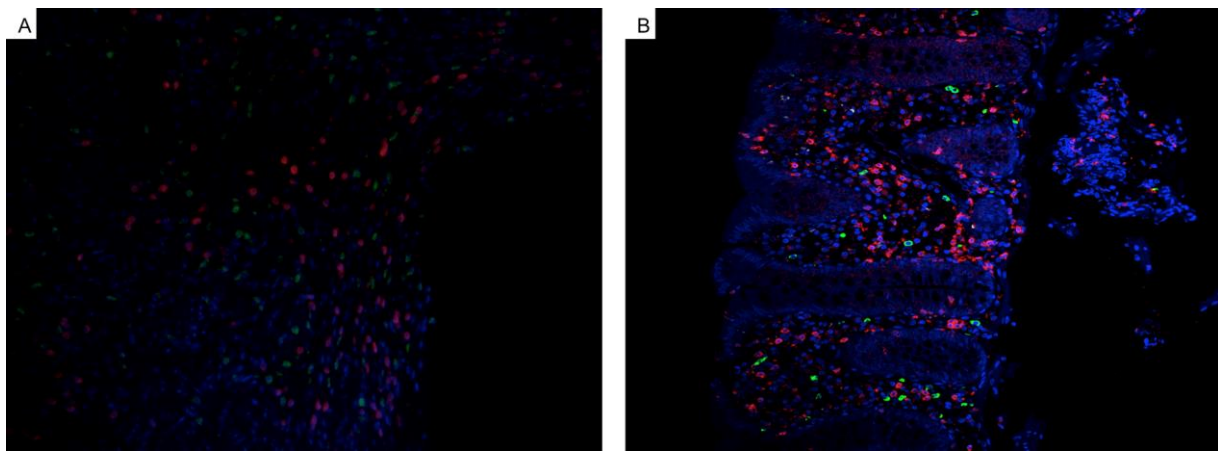


Abbildung 2.7.11.1 Vergleich der Bildqualität bei der Fluoreszenz- und konfokalen Mikroskopie. Aufnahmen mit (A) Fluoreszenzmikroskop und (B) Konfokal Mikroskop von gleicher CD3/IL-17 Doppelfärbung auf Appendix, jeweils in 20X Vergrößerung. CD3 ist rot und IL-17 grün zugeordnet. Blau erscheinen die mit DAPI markierten Zellkerne.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden die Fluoreszenzfarbstoffe, die sog. Fluorochrome mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (exzitatorische Wellenlänge) angeregt und geben dann selbst Licht mit etwas niedrigerer Energie (Emmisionswellenlänge) ab, was dann zum Detektor (z.B. Okular, Kamera oder *photomultipliertube* im konfokalen Mikroskop) gelangt. Dabei ist es von Bedeutung, dass die Wellenlänge des anregenden Lichtes in einem möglichst engen Bereich um den maximalen exzitatorischen Wellenlängenwert des zum detektierenden Fluorochromes ist. Dafür werden in einem Fluoreszenzmikroskop optische Filter (Anregungsfilter) zwischen der Lichtquelle (meistens Quecksilberdampflampe) und dem Strahlleiter geschaltet, bzw. bei der konfokalen Mikroskopie Laser exakter Wellenlängen als Lichtquelle verwendet. Des Weiteren wird auch das von dem Fluorochrom abgegebene Licht durch einen Emmisionsfilter geleitet, so dass nur dieses und kein gespiegeltes Anregungslicht zum Detektor gelangt. Im Fall einer Mehrfachfärbung müssen Fluorochrome mit unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften getrennt, jedoch auf einer Aufnahme abgebildet werden. Um dies zu erreichen ist auf die möglichst große Differenz der exzitatorischen und

Emmisionswellenlängen zu achten. Die Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Fluorochrome sind aus *Tabelle 2.4.3.3* zu entnehmen.

Die Abbildung der gesamten Biopsie auf einer Aufnahme bei gleichzeitiger Erhaltung einer zum Auszählen der Zellen geeigneten Auflösung bzw. Bildqualität war ebenfalls eine Herausforderung bei der Etablierung der Bildanalyse. Bei der Endoskopie entnommene Proben können eine Größe bis zu 1 cm haben. Somit ist ein möglichst kleines Zoom nötig, um das ganze Präparat in einem Bild zeigen zu können. Allerdings war bei solcher niedrigen Vergrößerung eine hochwertige Quantifizierung der Zellen, selbst bei einer großen Auflösung (4096 Pixel mal 4096 Pixel) nicht möglich. Andererseits, beim entsprechend großen Zoom waren mehrere Aufnahmen pro Biopsie nötig, und das Zusammensetzen dieser zu einem Gesamtbild hat Probleme bereitet. Auch die Nutzung der automatischen Aufnahmefunktion des konfokalen Mikroskops mit vorprogrammiertem Bewegen des Objektisches war keine brauchbare Methode, denn die Proben keine einheitliche Dicke aufweisen, weswegen die Fokusebene an jeder Stelle variiert. Eine automatische Scharfstellung durch das Mikroskop war nicht möglich. Es musste eine Methode entwickelt werden, bei der eine manuelle Zusammensetzung mehrerer, unter geeignetem Zoom fotografierten Teilen noch möglich war. Sowohl technische als auch zeitliche Bedingungen mussten dabei berücksichtigt werden. Die Angaben zur verwendeten Mikroskopie sind *Tabelle 2.7.11.1* zu entnehmen.

Mikroskop	Olympus Fluoview FV1000	Operationsprogramm	FV10-ASW3.0
Objektiv	UPlanSApo 20x/0,75 ∞ 0,17/FN 26.5	Scan-modus	Oneway
Kamera	Olympus XC30 1,6x	Scan-Geschwindigkeit	4µs/pixel
Gesamtzoom	32x	Filter	Linearized Kalman: 3
Multiline Ar Gas Laser	10%	Auflösung	2048pixel x 2048pixel
HeNe (G) Gas Laser	10%	Pixelgröße	0,310µm/pixel
LD405 Semicond. Laser	10%	Variable Einstellungen	Brennpunkt*, High Voltage**, Gain**, Offset**
Pinhole	100µm		

Tabelle 2.7.11.1 Technische Einstellungen der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie.

*in Abhängigkeit der Lokalisation

**in Abhängigkeit der Färbungsqualität des Präparats, jedoch einheitlich pro Präparat

Das Signal der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe wurde in Graustufen als Tiff-Datei gespeichert. Diesen wurden anschließend mit der Software *ImageJ* Farben zugeordnet (meistens rot, grün, blau); die Farbkanäle wurden in ein Bild zusammengefügt und in *(RGB).tif* Format konvertiert. Eine vollständig abfotografierte Darm-Biopsie besteht je nach Länge bzw. Durchmesser aus 3 bis 16 einzelner Aufnahmen in jeweils 12,6 MB Größe. Diese wurde dann mit *Adobe Photoshop CS6 Extended®* zu einer Gesamtaufnahme der Biopsie, bzw. im Falle eines, mit mehreren Biopsien (von gleicher Darmlokalisierung) versehenen Objektträgers, zu einem Gesamtbild aller Biopsien zusammengefügt (siehe Abb. 2.7.11.2 und 2.7.11.3). Dabei musste auf Überlappungen geachtet werden, damit eine Zelle ggf. nicht mehrfach ausgezählt wurde. Als Hilfe dafür wurde am Mikroskop schematische Skizzen von den grenzenden Regionen angefertigt.

Die Auszählung der Zellen wurde mit *ImageJ* durchgeführt. Sie erfolgte verblindet in fünf zufällig ausgewählten und nicht-überlappenden Bildausschnitten einer, oder mehreren kompletten Biopsien aus der jeweiligen anatomischen Lokalisation des Dickdarms (siehe Abb. 2.7.11.2). Im Falle der Foxp3 Färbungen (primärer Endpunkt) wurden alle biopsierte

anatomische Regionen vor- und unter EET ausgezählt und alle korrespondierenden Darmabschnitte pro Patienten verglichen (z.B. Rektum und Sigma vor- und Rektum und Sigma unter EET). Falls eine anatomische Darmregion nicht sowohl vor-, als auch unter EET biopsiert wurde, ist diese Lokalisation nicht in den Vergleich einbezogen worden. Im Falle anderer Färbungen, wie z.B. IL-17 (sekundäre Endpunkte) wurden jeweils korrelierende anatomische Darmlokalisationen vor- und unter EET verglichen (z.B. Rektum vor- und Rektum unter EET). Die Bildausschnitte waren mit 1652x918 Pixel definiert (Bilddarstellung 100%) und erlaubten den rechnerischen Rückschluss auf die Zellzahl/mm². Aus den fünf Sichtfeldern pro anatomischer Dickdarmlokalisation wurde ein Mittelwert gebildet, sodass im Falle der Foxp3 Färbung mehrere Mittelwerte vor- und unter EET pro Patienten entstanden, während bei den anderen Färbungen jeweils ein Mittelwert vor- und unter EET pro Patienten verglichen wurden (korrelierende anatomische Regionen).

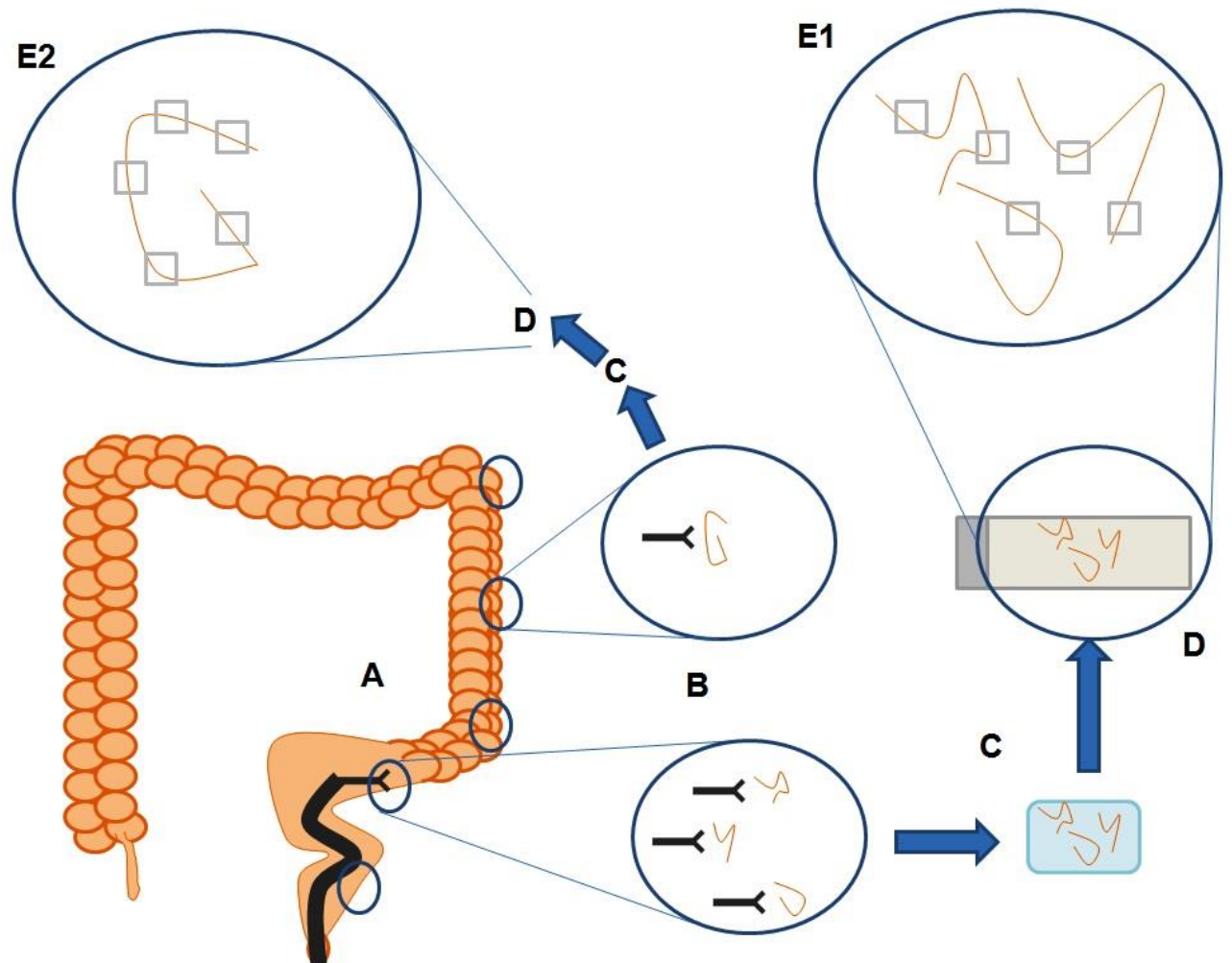


Abbildung 2.7.11.2 Schematische Darstellung der Methodik der Zellzählung.

(A) Im Rahmen der Koloskopie vor- und unter EET (siehe Kap. 2.1) wurden von unterschiedlichen anatomischen Regionen des Dickdarms Biopsien entnommen. (B) Die von einer Lokalisation entnommene Biopsien unterscheiden sich quantitativ bei jeder Lokalisation (min. 1, oft mehrere). (C) Die von einer Lokalisation entnommene Biopsien wurden gemeinsam in Paraffin eingebettet, geschnitten und (D) gemeinsam auf einen Objektträger aufgetragen. (E1) Im Falle mehrerer Biopsien pro Lokalisation wurden 5 zufällig ausgewählte, nicht überlappende, vordefiniert große Bildausschnitte verteilt auf allen Biopsien des Objektträgers ausgezählt und pro Darmlokalisierung ein Mittelwert gebildet. (E2) Im Falle einer entnommenen Biopsie pro anatomische Region wurden die 5 Sichtfelder auf dieser einen Biopsie verteilt ausgezählt und bildeten den Mittelwert.

Siehe auch *Abbildung 2.7.11.3*. Die Auszählung erfolgte blind, da die Proben kodiert waren und so die Zugehörigkeit zum Patienten bzw. zum Zeitpunkt (vor- und unter EET) unbekannt waren.

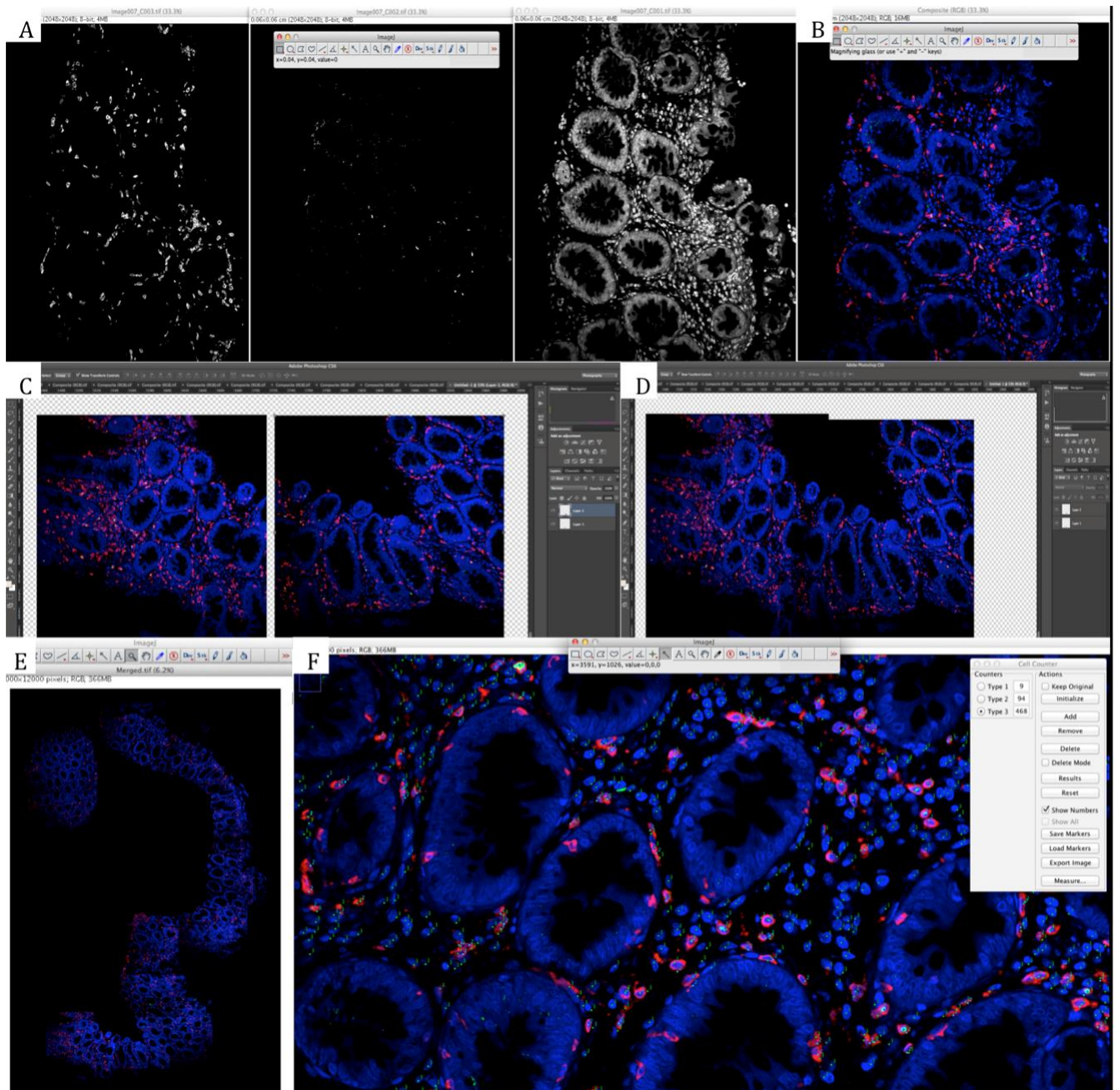


Abbildung 2.7.11.3 Methodik der Bildanalyse.

(A) Einzelne Aufnahmen in Graustufen werden in (B) *ImageJ* Farben zugeordnet und (C und D) in einem Bild zusammengesetzt. (E) Die zusammengesetzten Einzelaufnahmen werden zu einer einzelnen Aufnahme zusammengefügt, um die gesamte Biopsie in einem Bild zeigen zu können. (F) Anschließend werden die unterschiedlich markierten Zellen bzw. die Zellkerne in einem definierten Bereich mit *ImageJ* ausgezählt.

2.8 Statistik

Statistische Analysen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism, Version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Unterschiede wurden auf Signifikanz durch den gepaarten t-Test untersucht. Im Fall von wPCDAI und Gewicht wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Zur Untersuchung der Abhängigkeit des wPCDAI vom prozentualen Anteil der CD25^{high}Foxp3⁺ Zellen aus allen CD4⁺ Zellen im peripheren Blut wurde eine einfache lineare Regression berechnet. Die p-Werte wurden auf vier Nachkommastellen gerundet. Test-Ergebnisse mit einem p-Wert von kleiner als 0,0500 wurden als signifikant betrachtet. Zur besseren Darstellung des Vergleichs der Werte vor- und unter EET wurden zusätzlich Durchschnitt \pm Standardabweichung berechnet und gezeigt. In den Graphiken repräsentieren die Symbole die einzelne Werte der Patienten, die horizontale Linien stellen den Mittelwert dar.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Studienpatienten

In einem Zeitraum von 18 Monaten wurden insgesamt 15 pädiatrische Morbus Crohn Patienten mit aktiver Entzündung und vor Beginn einer EET auf der gastroenterologischen Station der Dr. von Haunerschen Kinderklinik in die Studie eingeschlossen. Das Durchschnittsalter der Patienten bei Therapiebeginn war 13.5 ± 2.2 Jahre. Zwölf der 15 Patienten waren Erstdiagnosen und damit therapie-naiv. Zwei Patienten waren mit Azathioprin und ein Patient mit 5-ASA vorbehandelt. Zehn Patienten zeigten einen Befall von Ileum und Kolon (Paris Klassifikation L3), drei Patienten eine isolierte Ileum-Beteiligung (L1) und bei einem Patienten gab es einen ausschließlichen Befall des Dickdarms (L2). Acht Patienten hatten zusätzlich Befall im oberen Gastrointestinaltrakt (L4). Die Krankheitsaktivität gemessen mit dem wPCDAI zu Beginn der Studie war bei vier Patienten leicht, bei acht mittel und bei drei Patienten schwer ausgeprägt. Vierzehn Patienten wurden mit der polymeren Formula Modulen IBD® von Nestlé® und ein Patient mit Neocate®, einer Elementarnahrung von Nutricia® therapiert.

Im Fall aller 15 Patienten wurden vor- und unter EET klinische und laborchemische Verlaufsparemeter bestimmt, sowie die Charakterisierung der Th-Subpopulationen im peripheren Blut durchgeführt. Bei 12 der 15 eingeschlossenen Patienten konnte eine Immunfluoreszenz-Charakterisierung erfolgen, bei 3 Patienten waren entweder keine Biopsien vor EET verfügbar (z.B. Endoskopie in externer Klinik) oder eine zweite Endoskopie unter EET war kontraindiziert oder anderswertig nicht möglich.

Die Patienteneigenschaften bei Aufnahme in die Studie und vor Therapiebeginn sind in *Tabelle 3.1.1* zusammengefasst.

Ergebnisse

Patientencharakteristika		Vor EEN
Geschlecht	männlich	8/15 (53%)
	weiblich	7/15 (47%)
Alter bei Erstmanifestation (in Jahren)		12.0 ± 2.8
Alter bei Diagnose (in Jahren)		12.4 ± 2.9
Alter bei Einschluss in die Studie (in Jahren)		13.5 ± 2.2
Positive Familienanamnese		3/15 (20%)
Extraintestinale Symptome		0/15 (0,0%)
Perianale Symptome		6/15 (40%)
Krankheitslokalisation	Terminales Ileum (L1)	3/15 (20%)
	Kolon (L2)	1/15 (6,7%)
	Ileum und Kolon (L3)	10/15 (67%)
	Oberer GIT (L4)	8/15 (53%)
Krankheitsverhalten	Nicht-strikтуриierend, nicht-penetrierend (B1)	14/15 (73%)
	Strikтуриierend (B2)	1/15 (6,7%)
	Penetrierend (B3)	0/15 (0,0%)
	Perianale Beteiligung	6/15 (40%)
Neu diagnostiziert und therapie-naiv		12/15 (80%)
Unter stabiler Therapie*		3/15 (20%)
	Azathioprin	2/15 (13%)
	5-Aminosalizylate	1/15 (6,7%)
Leichte Krankheitsaktivität (wPCDAI ≤ 40 Punkte)		4/15 (27%)
Mäßige Krankheitsaktivität (wPCDAI > 40 und ≤ 57.5 Punkte)		8/15 (53%)
Schwere Krankheitsaktivität (wPCDAI > 57.5 Punkte)		3/15 (20%)
Zeit unter EET bis zur Verlaufsuntersuchung (in Tagen)		25 ± 4 (min.-max.19-33)

Tabelle 3.1.1 Patientencharakterisierung vor Therapiebeginn.

Alter und Therapiedauer sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt (minimales und maximales Zeitintervall in Klammern).

*Keine Änderung der Therapie innerhalb von 3 Monaten vor Studieneinschluss.

3.2 Klinischer Verlauf

3.2.1 Verbesserung des wPCDAI und des Körpergewichts

Drei bis vier Wochen nach Beginn der EET (25 ± 4 Tage EET) kam es zu einer signifikanten Verbesserung der Krankheitsaktivität. Der wPCDAI (siehe Kap. 2.3.2) nahm im Mittel von 48,5 auf 15,3 Punkte ab ($p = 0,0007$) (Abb. 3.2.1 A). Außerdem konnte eine Zunahme des Körpergewichts beobachtet werden, die sich in einer nicht-signifikanten Verbesserung der alters- und geschlechtsspezifischen z-Scores um 0,18 äußerte (Abb. 3.2.1 B).

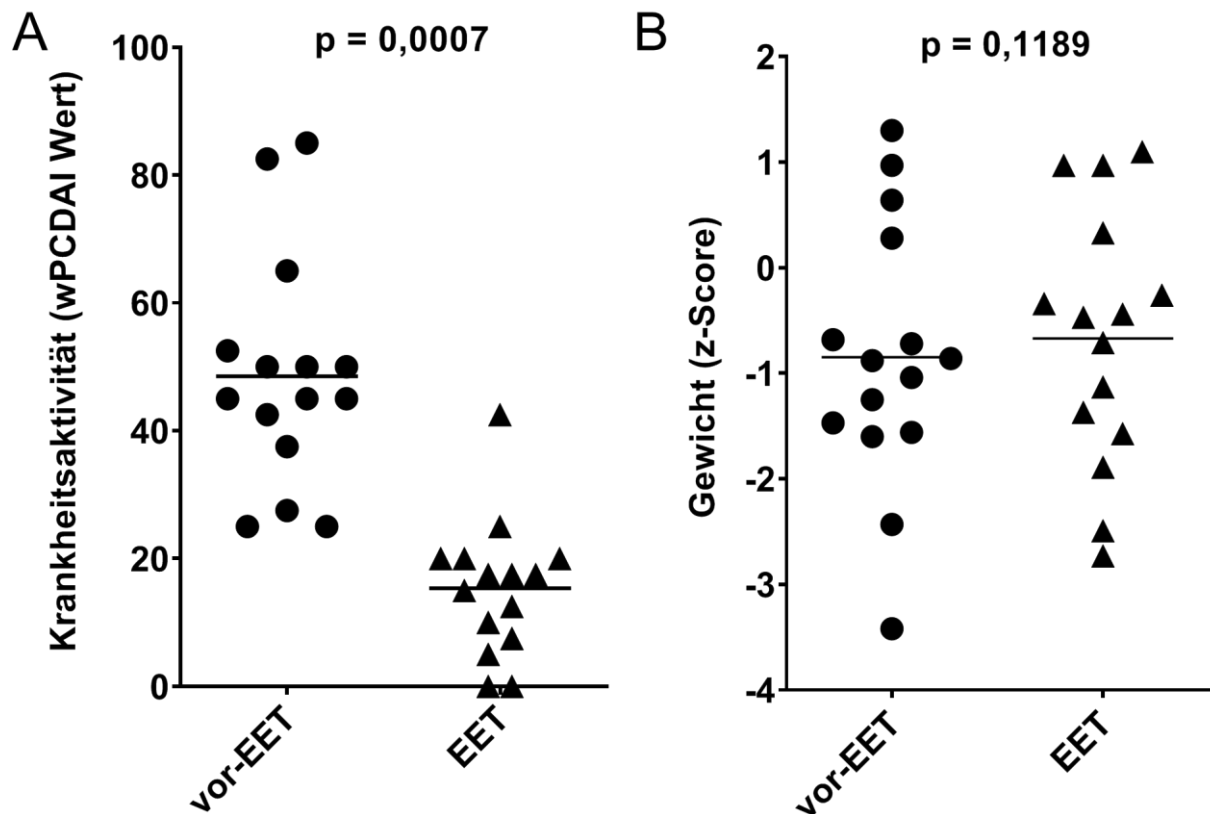


Abbildung 3.2.1 Verbesserung der Krankheitsaktivität und des Körpergewichts.

Die Krankheitsaktivität (wPCDAI) ist in (A) und die Gewichtsentwicklung der Patienten in (B) dargestellt. Das Gewicht ist als Standardabweichung (z-Score) zur WHO Referenzpopulation (2007 WHO) dargestellt. Einem Symbol ist je ein Patient zugeordnet. Die horizontale Linie zeigt den Mittelwert. „Vor EET“ bezeichnet den Zeitpunkt vor Beginn, „EET“ den, unter Ernährungstherapie.

3.2.2 Verbesserung der Entzündungswerte im peripheren Blut

Nach drei bis vier Wochen Ernährungsintervention kam es zu einem signifikanten Rückgang der Entzündungswerte: CRP, BSG, Leukozyten und neutrophile Granulozyten (*Abb. 3.2.2*). Eine Normalisierung des CRP wurde bei acht, der BSG bei zwei Patienten und ein Abfall von beiden Werten unterhalb des Referenzwertes bei einem Patienten beobachtet. Des Weiteren wurde eine Abnahme der Fibrinogen-Konzentration im peripheren Blut, als Zeichen der Abnahme der chronischen Entzündung (neben BSG) gefunden. Die Hämoglobinkonzentration verbesserte sich ebenfalls (*Abbildung 3.2.2*). In der Zahl der Thrombozyten zeigte sich ebenfalls eine Tendenz der Abnahme, während sich die Zahl der Lymphozyten nicht änderte, bzw. eine leichte, nicht signifikante steigende Tendenz zeigte (Daten nicht gezeigt).

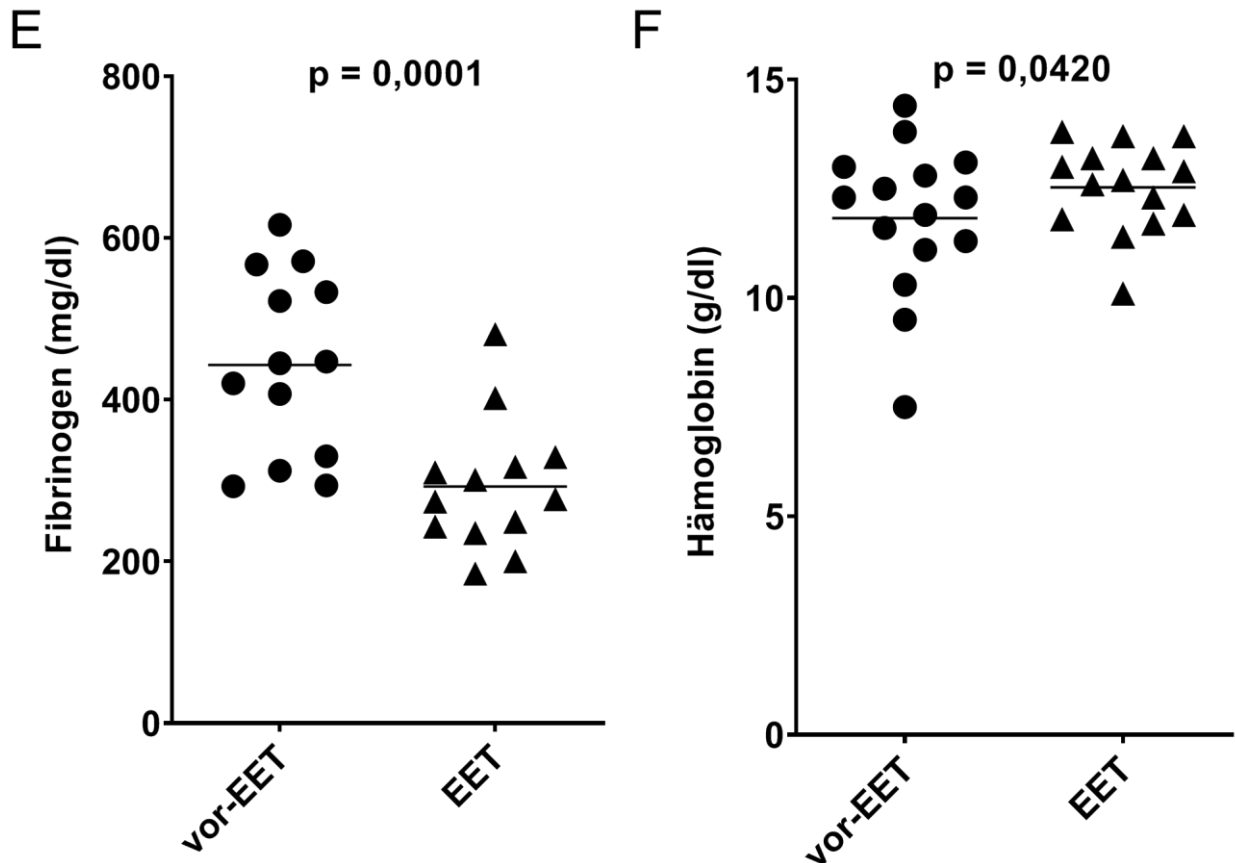


Abbildung 3.2.2 Laborchemischer Rückgang der Entzündungsparameter im Blut.

Signifikante Abnahme der Werte von (A) CRP, (B) BSG und (E) Fibrinogen im Blut. Fibrinogen wurde bei 13 von 15 Patienten bestimmt. (C und D) Ebenfalls signifikante Abnahme der Leukozyten- und neutrophile Granulozytenzahlen im peripheren Blut und (F) Erhöhung des Hämoglobins im EDTA-Blut unter EET. Die Symbole zeigen die gemessenen laborchemische Parameter vor- und unter EET. Die horizontale Linie zeigt den Mittelwert.

3.3 Einfluss der EET auf den histopathologischen Entzündungsaktivitätsgrad

Basierend auf histopathologischen Begutachtungen wurde die mikroskopische Entzündungsaktivität auf einer Skala von 0 bis 4 (siehe Kapitel 2.3.4) bei 10 der insgesamt 15 Patienten bestimmt. Bei diesen Patienten waren Biopsien vor- und unter EET vorhanden und eine Begutachtung durch das Institut für Pathologie lag vor. In dieser semiquantitativen Analyse zeigte sich keine Besserung der Entzündungsaktivität in der Histologie (Abb. 3.3).

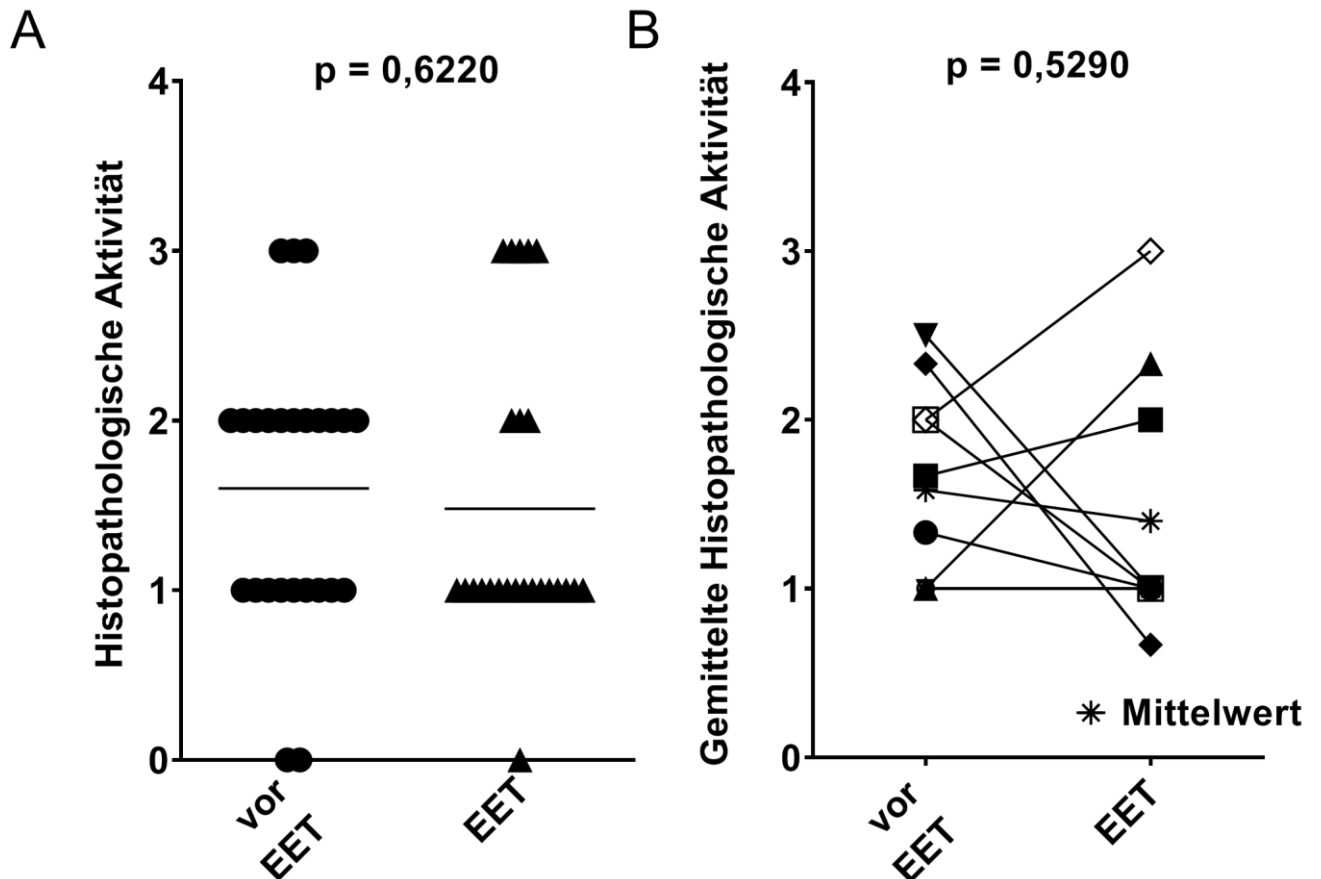


Abbildung 3.3 Histologischer Entzündungsgrad bei zehn Studienteilnehmern.

Keine signifikante Besserung der histologischen Entzündungsaktivität nach drei bis vier Wochen EET. (A) Vergleich der einzelnen Biopsien aus dem Sigma und Rektum und (B) des gemittelten Aktivitätsgrades aller Biopsien jeweils vor- und unter EET der jeweiligen Patienten. Zwei bis drei Biopsien pro Patienten wurden beurteilt. Den Symbolen sind die jeweilige Werte der Entzündungsaktivität pro Patientenbiopsat vor- und unter EET zugeordnet. Zusätzlich ist die Entwicklung des Mittelwertes aller gemittelten histopathologischen Krankheitsaktivitätsgrade aller Patienten dargestellt.

3.4 Durchflusszytometrische Untersuchung des peripheren Blutes

3.4.1 Bestimmung der T-Zellen im peripheren Blut

Obwohl die Zahl der Leukozyten im peripheren Blut unter EET abnahm (*Abb. 3.2.2 C*), blieb die absolute Zahl der CD3⁺T-Zellen konstant (Daten nicht gezeigt). Innerhalb des CD3⁺ T-Zellpools, blieb auch der Anteil der CD4⁺ Zellen vor- und unter Ernährungstherapie konstant (*Abb. 3.4.1 A*). Ebenso zeigten die absoluten Zahlen der CD4⁺ Th-Zellen keine Veränderung (Mittelwerte vor-EET 1073 ± 265/μl Blut und unter EET 1127 ± 284/μl Blut) (*Abb. 3.4.1 B*). Entsprechend fand sich auch bei den CD3⁺CD4⁻ T-Zellen keine absoluten oder prozentualen Änderungen (Daten nicht gezeigt).

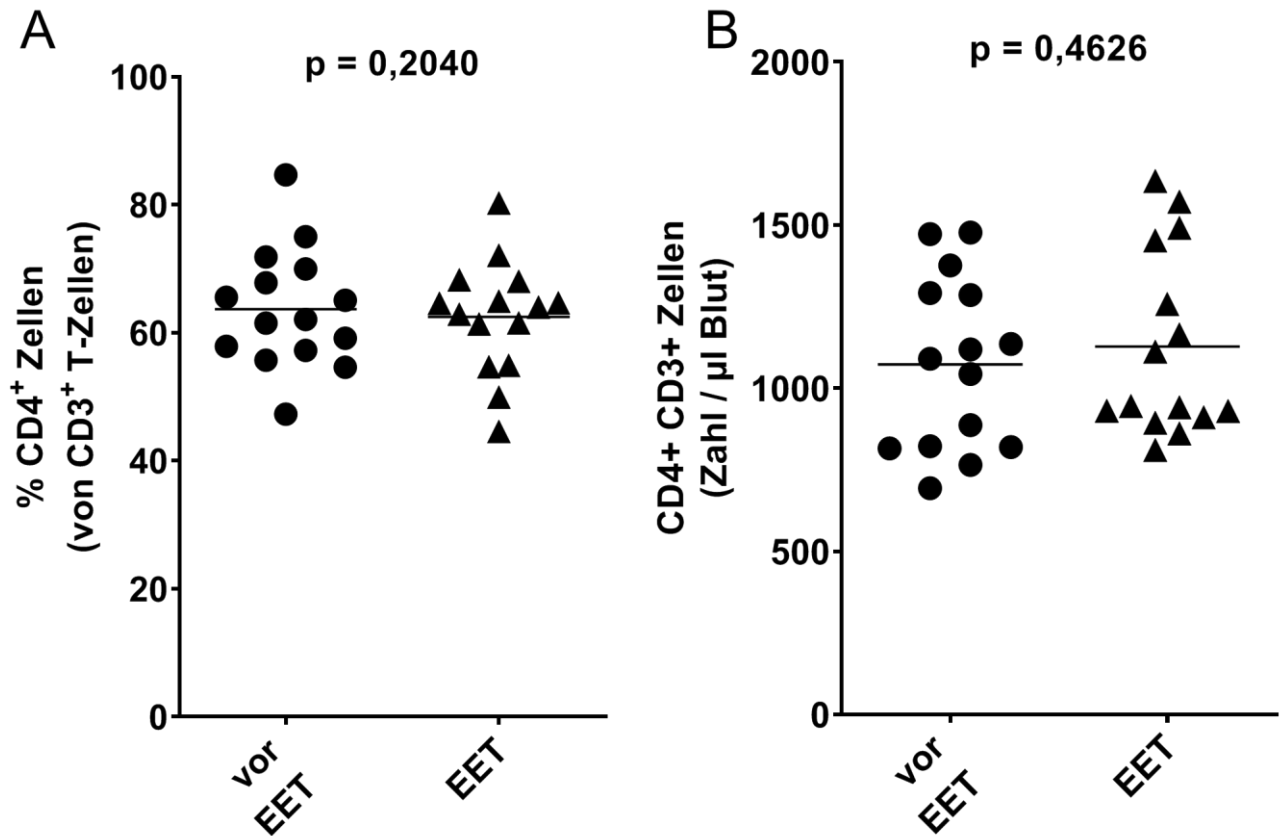


Abbildung 3.4.1 Zahl der T-Zellen, im peripheren Blut unter EET.

CD3⁺, CD4⁺ und nicht-CD4⁺-Zellen wurden im peripheren Blut vor und während der EET bestimmt. (A) Es fanden sich keine Änderungen in der Frequenz der CD4⁺ Anteil, von allen T-Zellen. (B) Ebenfalls keine signifikante Änderung in der absoluten Zahl der CD4⁺T-Helfer Zellen.

3.4.2 Bestimmung der T-Helfer-Zellsubpopulationen im peripheren Blut

Regulatorische T-Zellen (Tregs) wurden durch eine intrazelluläre Färbung des Transkriptionsfaktors Foxp3 innerhalb der CD4⁺CD25^{high} T-Zellen identifiziert. Die Zahl der regulatorischen CD4⁺Foxp3⁺CD25^{high} T-Zellen (Tregs) nahm unter Ernährungstherapie im peripheren Blut signifikant zu (Abb. 3.4.2.1). Es kam sowohl zu einem relativen wie auch absoluten Anstieg der Foxp3⁺ Tregs (Abb. 3.4.2.1 A und B). Der relative Anteil der CRTH2⁺ (*Chemoattractant Receptor-homologous molecule expressed on T-Helper type 2 cells*) Th-Zellen als Maß für die Th2-Subpopulation und der relative Anteil der CCR6⁺ Th-Zellen, welche u.a. Th17-Zellen beinhalten (als Ausdruck der Th17 vermittelten pro-inflammatorischen Vorgängen) blieb konstant. (Abb. 3.4.2.1 C und D).

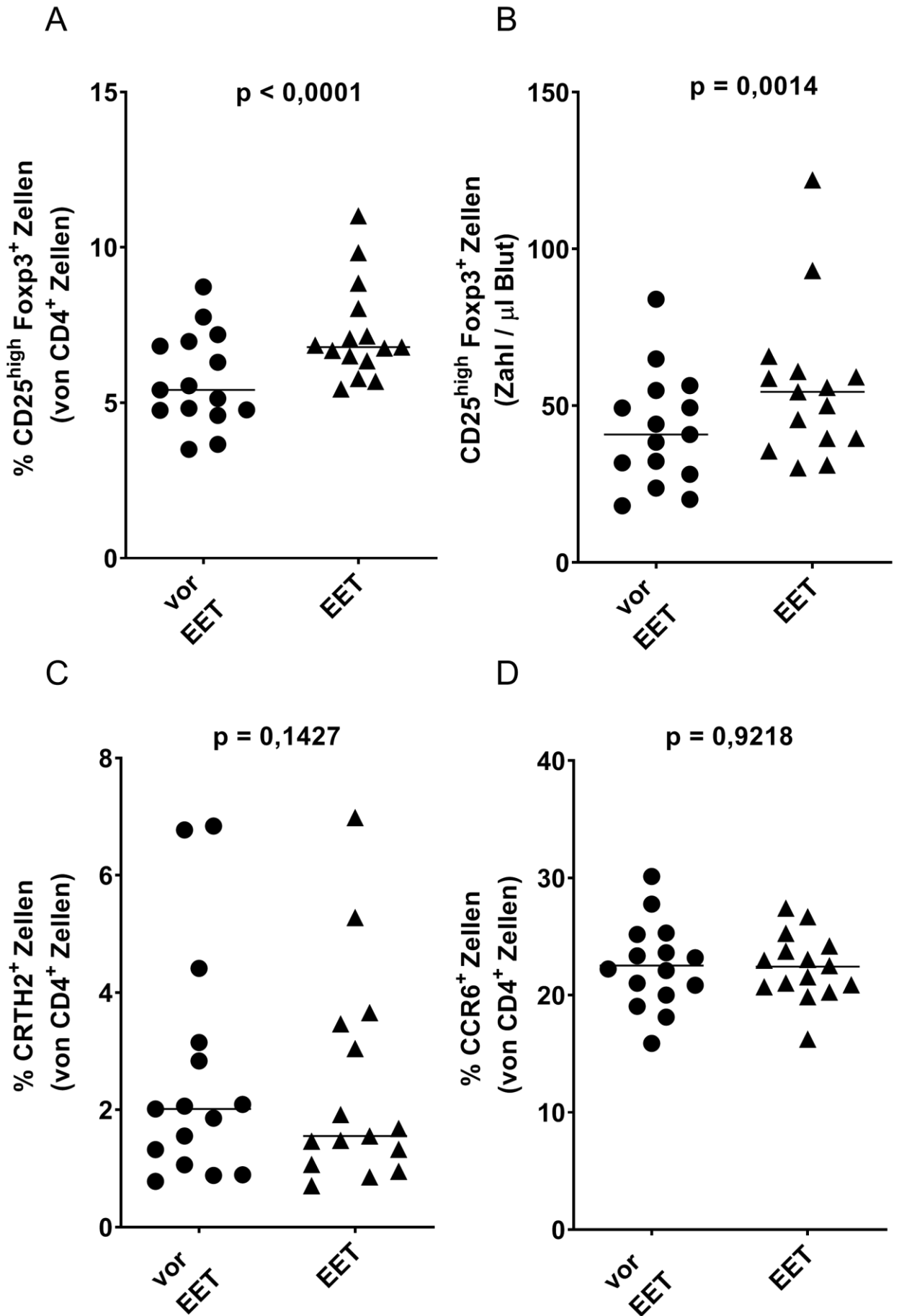


Abbildung 3.4.2.1 T-Helfer-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut vor- und unter EET.

Zunahme der Zahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut unter EET. (A) Signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils und (B) der absoluten Zellzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut unter EET. (C) Die relativen Anteile der Th2-Subpopulation und (D) der CCR6⁺ Zellen, die u.a. auch die Th17-Zellen beinhalten, blieb unverändert. Jedes Symbol repräsentiert einen Patienten und die Zellzahl aus dem peripheren Blut vor- und unter EET. Die horizontalen Linien zeigen den jeweiligen Mittelwert.

Des Weiteren zeigte sich ein umgekehrt-linearer Zusammenhang zwischen der, im wPCDAI ausgedrückten klinischen Krankheitsaktivität, und der Zahl der Treg-Zellen im peripheren Blut (Abb. 3.4.2.2).

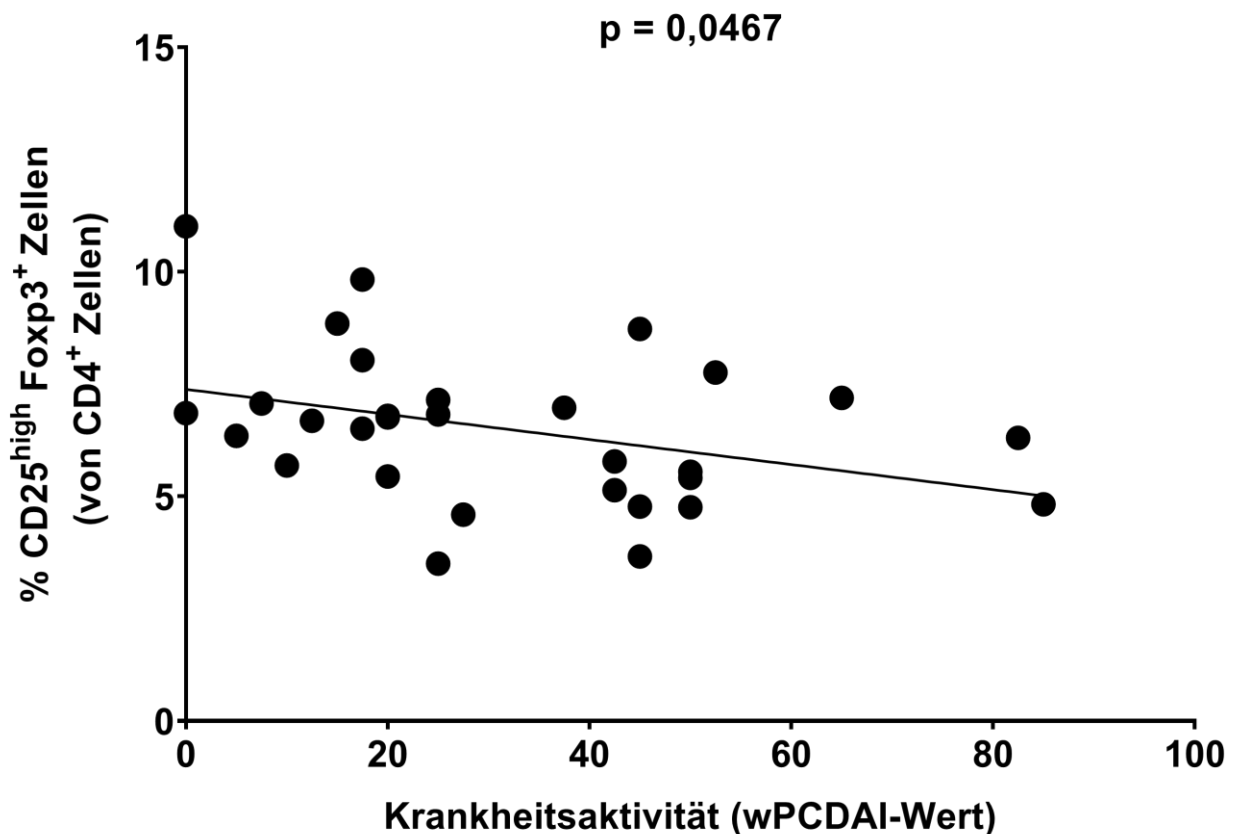
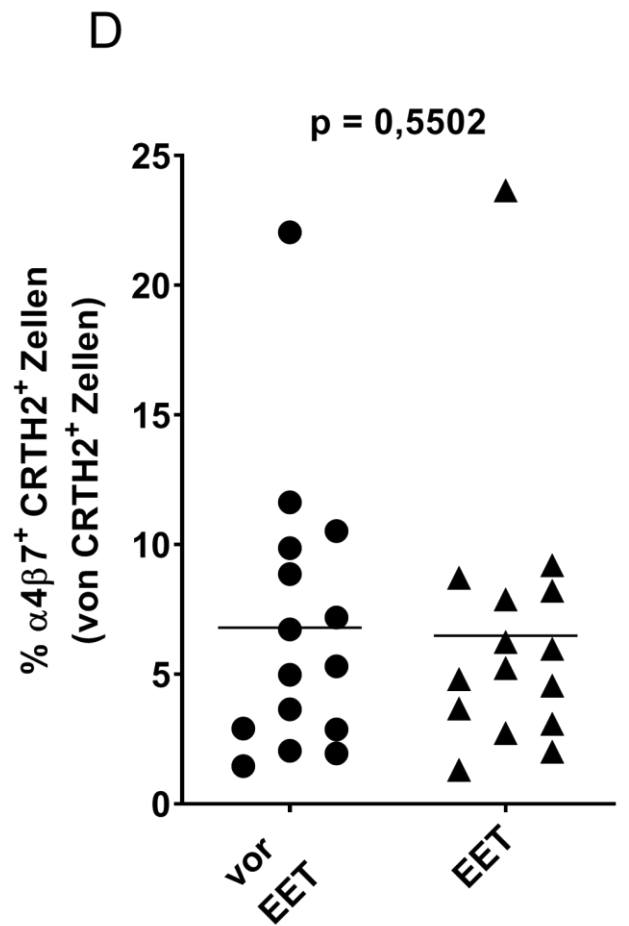
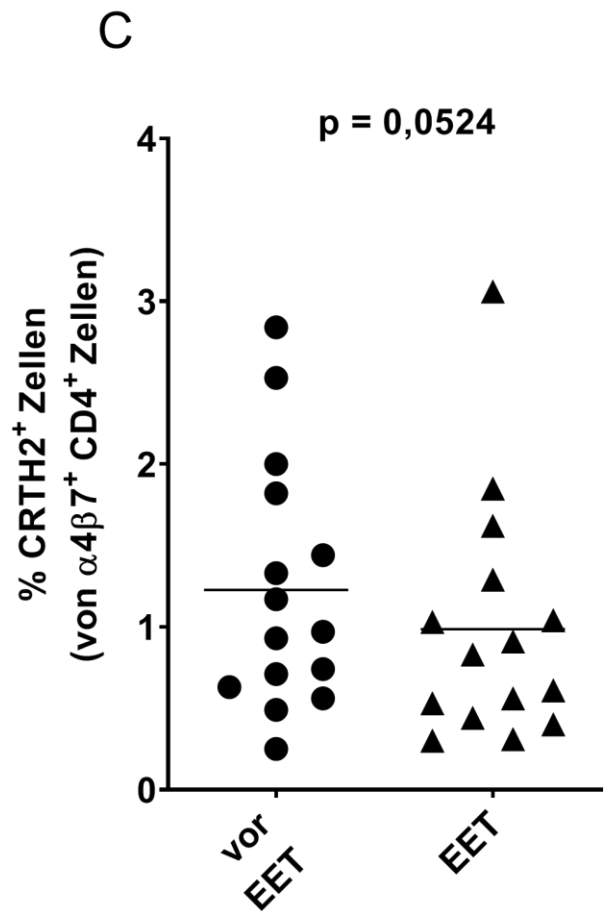
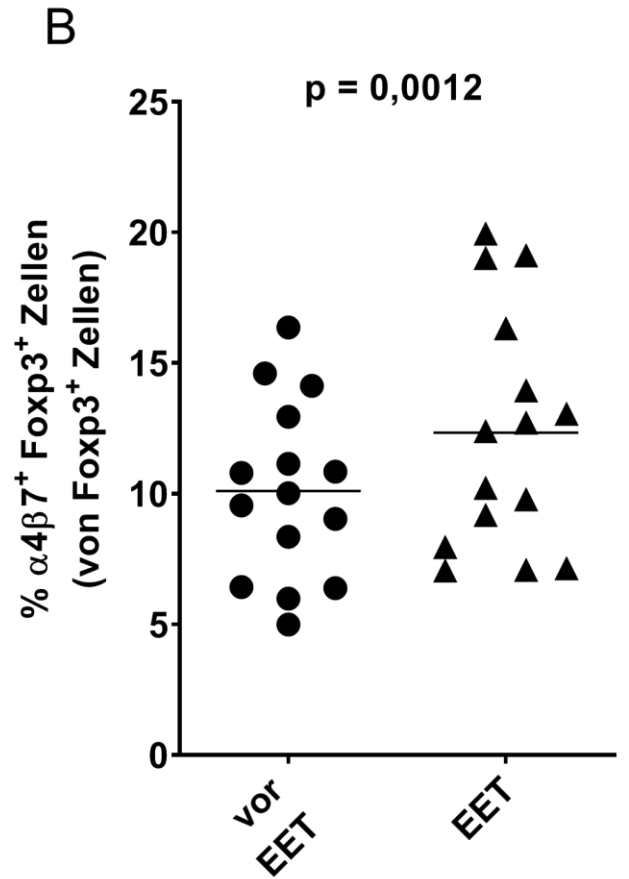
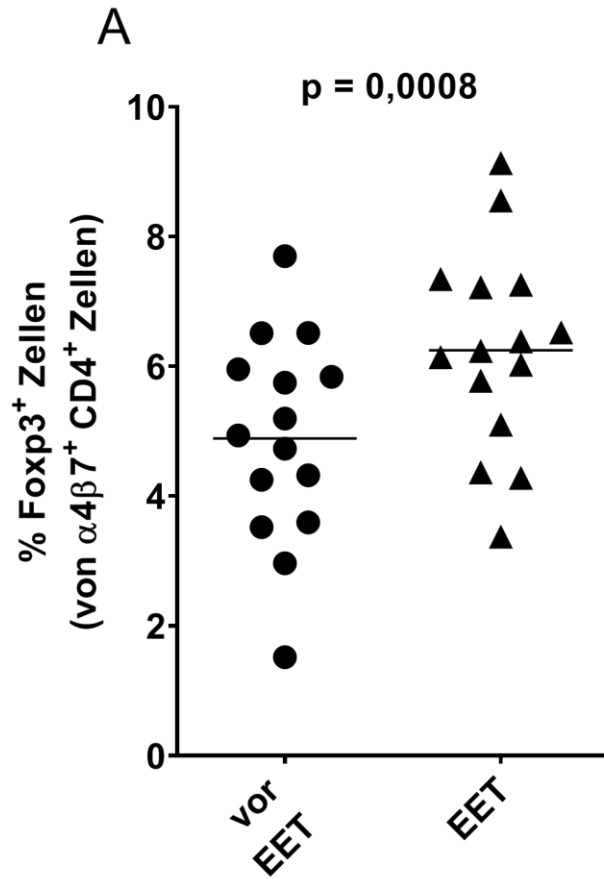


Abbildung 3.4.2.2 Korrelation zwischen der klinischen Krankheitsaktivität im Zusammenhang mit der Anzahl der Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut. Signifikanter, umgekehrt-linearer Zusammenhang zwischen dem wPCDAI-Wert und der relativen Frequenz der CD25^{high}Foxp3⁺ Th-Zellen im peripheren Blut. Die Symbole sind der jeweilige Schnittpunkt aus dem Wert der Krankheitsaktivität und dem prozentualen Anteil der Foxp3 Zellen im peripheren Blut für jeden Patienten vor und unter der EET.

3.4.3 Bestimmung der Th-Subpopulationen innerhalb der *Gut-Homing* T-Zellen im peripheren Blut

T-Zellen, welche in die Lamina propria des Darms einwandern können, sind durch die Expression der Integrine $\alpha 4\beta 7$ charakterisiert. Um die Migration der CCR6⁺, CRTH2⁺ und

CD25^{high}Foxp3⁺ Th-Zellen zwischen peripherem Blut und der Darmmukosa zu untersuchen, wurden Anteile der jeweiligen Th-Subgruppen unter allen durch das spezifische Integrin $\alpha 4\beta 7$ markierten, sogenannten *Gut-Homing* CD4⁺ Zellen bestimmt. Hierbei zeigte sich eine deutlich signifikante Erhöhung des Anteils Foxp3⁺ Treg Zellen unter aller *Gut-Homing* CD4⁺ Zellen (*Abb. 3.4.3.1 A*). Im Falle der CRTH2⁺ und CCR6⁺ T-Zellen war wiederum auch hier keine signifikante Änderung zu sehen (*Abb. 3.4.3.1 C und E*). Umgekehrt war auch der Anteil der Foxp3⁺ Tregs mit *Gut-Homing* Integrinen $\alpha 4\beta 7^{\text{high}}$ unter aller Foxp3⁺ Zellen unter EET signifikant angestiegen, während die Zahl *Gut-Homing* Zellen unter den CRTH2, sowie unter den CCR6⁺ (als Ausdruck für die Th2 bzw. Th17 vermittelte pro-inflammatorische Reaktion) unverändert blieb (*Abb. 3.4.3.1 B, D und F*).



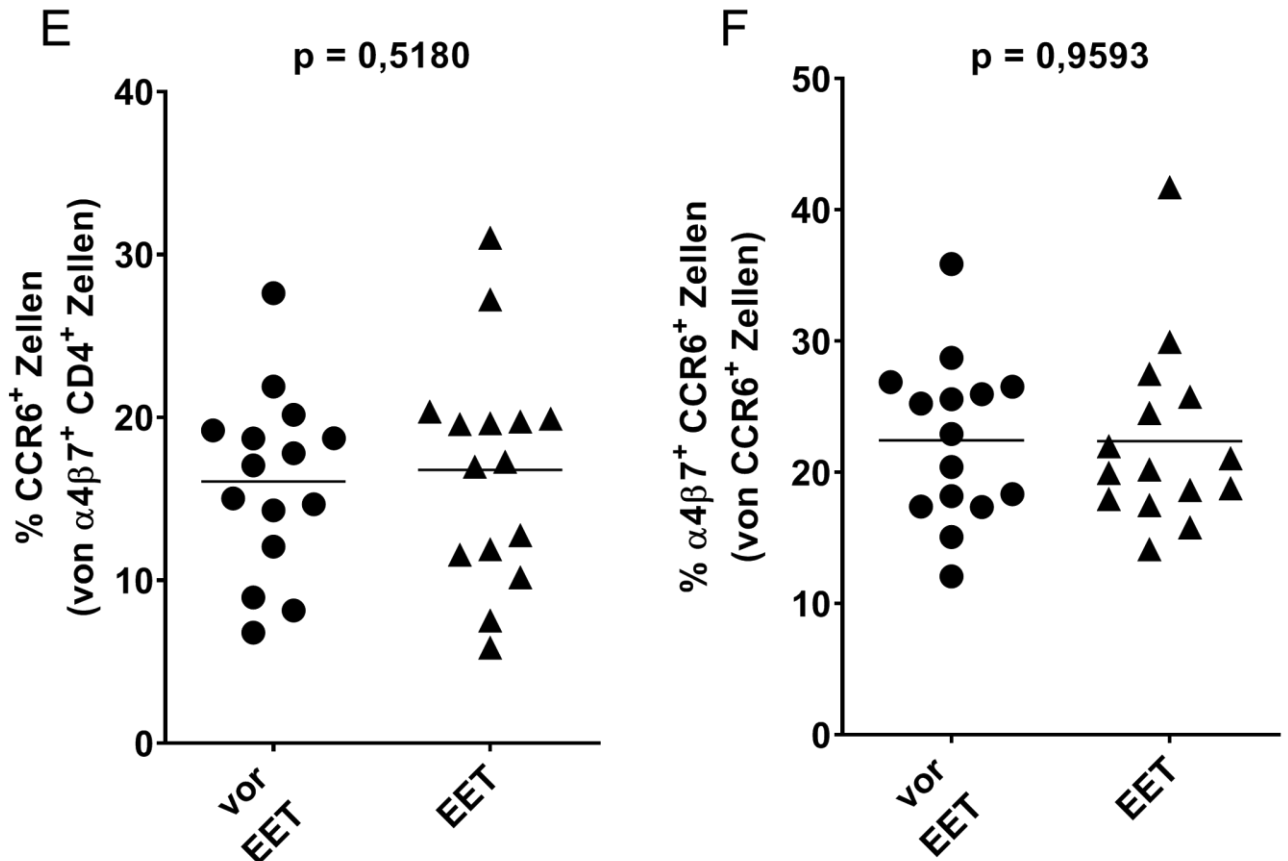


Abbildung 3.4.3.1 Veränderungen im Anteil Treg- und Th17-Zellen unter den *Gut-Homing*-Zellen unter EET.

(A) Signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils der regulatorischer T-Zellen unter aller *Gut-Homing* Zellen im peripheren Blut unter EET. (B) Auch waren unter allen regulatorischen T-Zellen unter EET mehr $\alpha 4\beta 7^{\text{high}}$ Zellen. (C) CRTH2 positive Th2-Zellen zeigen sich unter den $\alpha 4\beta 7^{\text{high}}$ Zellen unter EET nicht signifikant verändert und (D) auch $\alpha 4\beta 7^{\text{high}}$ Zellen unter den Th2-Zellen bleiben unverändert. (E) Anteil CCR6⁺ Th-Zellen unter den $\alpha 4\beta 7^{\text{high}}$ CD4⁺ Zellen, sowie (F) der Anteil $\alpha 4\beta 7^{\text{high}}$ Zellen unter den CCR6⁺ Th-Zellen ändern sich ebenfalls nicht signifikant. Den Symbolen sind jeweils die relativen Zahlen vor- und unter EET zugeordnet, die horizontalen Linien zeigen den jeweiligen Mittelwert.

3.5 Immunfluoreszenzhistochemische Untersuchung der Lamina propria

3.5.1 Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen in der Lamina propria

Im Fall von 12 Patienten konnten vergleichbare Kolon-Biopsien aus dem Colon descendens, Colon sigmoideum und Rektum vor- und 3 Wochen nach Beginn der Ernährungstherapie untersucht werden. Pro Patienten standen Biopsien (bzw. Schnitte) von ein bis drei anatomische Regionen des Darms (Colon descendens, Colon sigmoideum und Rektum) zur Verfügung. Im Durchschnitt konnten pro Patient 2-3 Regionen untersucht werden. Auf jedem Schnitt einer anatomischen Region befanden sich mehrere Biopsien, welche vollständig für CD3 und Foxp3 gefärbt und digitalisiert wurden (*Abb. 3.5.1.1. A*). Fünf zufällig ausgewählte Bildbereiche wurden quantifiziert, daraus die Zahl der Zellen/mm² errechnet und ein Mittelwert

pro anatomische Region gebildet (siehe auch Kapitel 2.7.11 und *Abb. 2.7.11.2*). Die Gesamtzahl der infiltrierenden CD3⁺ T-Zellen änderte sich nicht durch eine EET (*Abb. 3.5.1.1 B*). Nach drei Wochen Ernährungstherapie ist der Anteil regulatorischer T-Zellen (Foxp3⁺ und CD3⁺ markiert) unter allen T-Zellen (CD3⁺ markiert) signifikant erniedrigt ($12.2 \pm 8.1\%$ vor- und $7.2 \pm 3.9\%$ unter-EET) (*Abb. 3.5.1.1 C*). Es zeigte sich auch ein signifikanter Rückgang der absoluten Zahl von Treg-Zellen (*Abb. 3.5.1.1 D*) von 124 ± 92 Zellen/mm² vor- und 80 ± 71 Zellen/mm² unter EET.

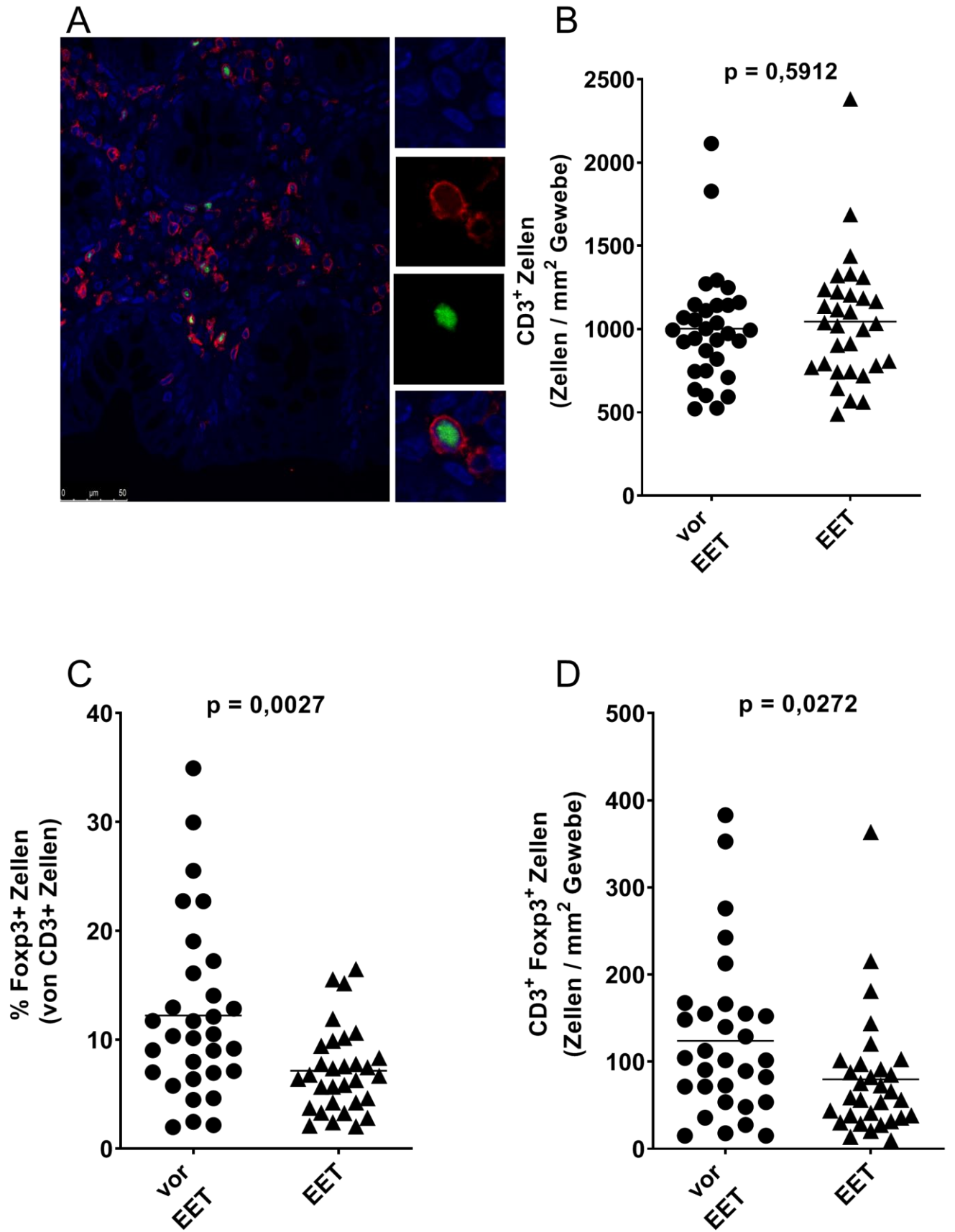


Abbildung 3.5.1.1 Abnahme der regulatorischen Foxp3⁺T-Zellen in der Lamina propria des Kolons unter EET.

(A) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von CD3 und Foxp3 an Sigma-Gewebe von einem Patienten. CD3 ist rot, Foxp3 grün zugeordnet. Blau erscheinen die mit DAPI markierten Zellkerne. (B) Konstante Gesamtzahl der CD3 markierten T-Zellen nach Beginn EET. Gleichzeitig signifikanter Rückgang der relativen (C) und der absoluten (D) Zellzahl der Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen. Die horizontalen Linien zeigen die Mittelwerte. Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert von fünf zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern der Biopsien aus dem C. descendens, C. sigmoideum oder dem Rektum. In jeder anatomischen Region wurden mehrere Biopsien genommen und in einem Paraffinblock eingebettet und gemeinsam geschnitten. Im Durchschnitt wurden für jeden Patienten 2-3 anatomische Regionen vor- und unter EET analysiert. Es wurden immer korrelierende Regionen vor- und unter EET verglichen. Die horizontale Linien zeigen den jeweiligen Mittelwert.

Wird die Entwicklung der Zellzahl der Foxp3⁺ Zellen nicht in der Gesamtheit aller Biopsien vor- und 3 Wochen nach Beginn der EET, sondern auch in den jeweiligen korrespondierenden Darmabschnitten (Linke Flexur bzw. Colon descendens, Colon sigmoideum und Rektum) verglichen, ist ein rückläufiger Trend der regulatorischen T-Zellen einzeln in allen Abschnitten zu erkennen (*Abb. 3.5.1.2*). Die absolute Zahl der Treg-Zellen nahm im Bereich der linken Flexur/Colon descendens von gemittelt 127 ± 64 Zellen/mm² auf 91 ± 66 Zellen/mm² ab (*Abb. 3.5.1.2 A*). Im Sigmoideum sind 125 ± 99 Zellen/mm² vor Beginn- und 68 ± 41 Zellen/mm² nach drei Wochen EET gezählt worden (*Abb. 3.5.1.2 B*). Im Rektum waren im Mittel 121 ± 110 Zellen/mm² vor- und 82 ± 98 Zellen/mm² unter EET (*Abb. 3.5.1.2 C*).

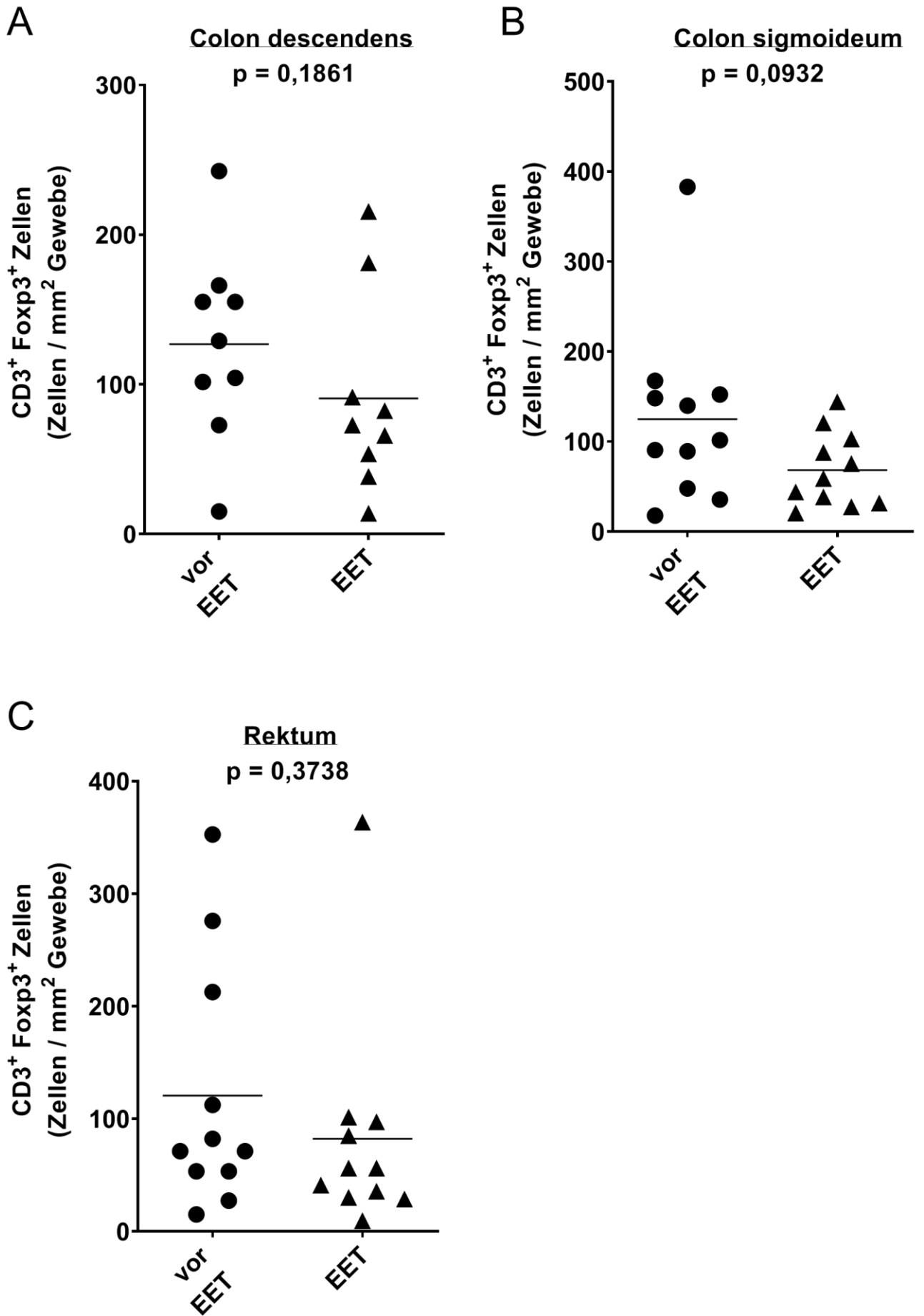


Abbildung 3.5.1.2 Abnahme der regulatorischen T-Zellzahl in der Lamina propria der korrespondierenden Darmabschnitten unter EET bei 12 Patienten.

Nicht-signifikanter Rückgang der absoluten Zellzahl der CD3⁺Foxp3⁺ positiven regulatorischen T-Zellen in den jeweiligen Darmabschnitten* vor- und nach drei Wochen EET. (A) Colon descendens (B) Colon sigmoideum und (C) Rektum. Die horizontalen Linien zeigen die Mittelwerte. * Von den insgesamt 12 Patienten standen bei einem Patienten Biopsien nur aus C. descendens und Rektum, bei zwei Patienten aus Sigma und Rektum und bei einem Patienten lediglich aus Sigma zur Verfügung. Den Symbolen sind die Mittelwerte der Zellzahlen aller ausgewerteten Gesichtsfelder von mehreren Biopsien aus den jeweiligen anatomischen Regionen des Kolons vor- und unter EET zugeordnet, die horizontalen Linien zeigen den jeweiligen Mittelwert.

3.5.2 Erweiterte Charakterisierung des entzündlichen Infiltrats der Lamina propria

Um die gleichzeitig ablaufenden anti- und proinflammatorischen Prozesse in der entzündeten Lamina propria untersuchen zu können, wurden den anti-entzündlichen Treg-Zellen entgegengesetzt auch mehrere entzündungsfördernde Zellen in den entsprechend zugeordneten Biopsien charakterisiert. So wurden Veränderungen in der Zahl der Th17-Zellen unter EET untersucht. Da keine eindeutige nukleäre ROR γ t Färbung gelungen ist, wurden die Th17-Zellen mit Hilfe einer Färbung der Oberflächenmoleküle CD3 und IL-17 quantifiziert. Dies wurde auf Biopsien von jedem Patienten aus den Darmabschnitten durchgeführt, die in der CD3⁺Foxp3⁺-Färbung den größten Unterschied in der relativen Foxp3⁺-Zellzahl vor- und unter EET gezeigt haben. Diese Stellen zeigten also eine besonders rapide Änderung der Immunregulation. Dabei wurden die Proben natürlich weiterhin korrelierend und blind untersucht. Es zeigte sich ein nicht-signifikanter Rückgang aller IL17⁺ Zellen von durchschnittlich 265 ± 149 Zellen/mm² auf 190 ± 96 Zellen/mm² (*Abb. 3.5.2.1 C*) und eine signifikante Abnahme der Th17 Zellen (CD3⁺IL17⁺) von 39 ± 22 Zellen/mm² auf 18 ± 10 Zellen/mm² (*Abb. 3.5.2.1 D*). Färbungen mit einem zweiten Antikörper eines weiteren kommerziellen Anbieters bestätigten die Beobachtung.

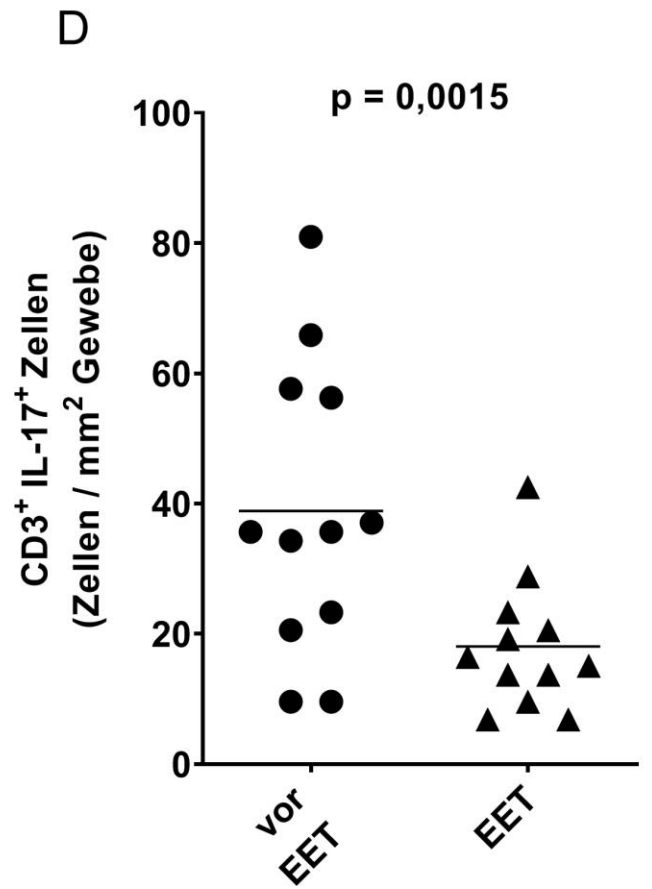
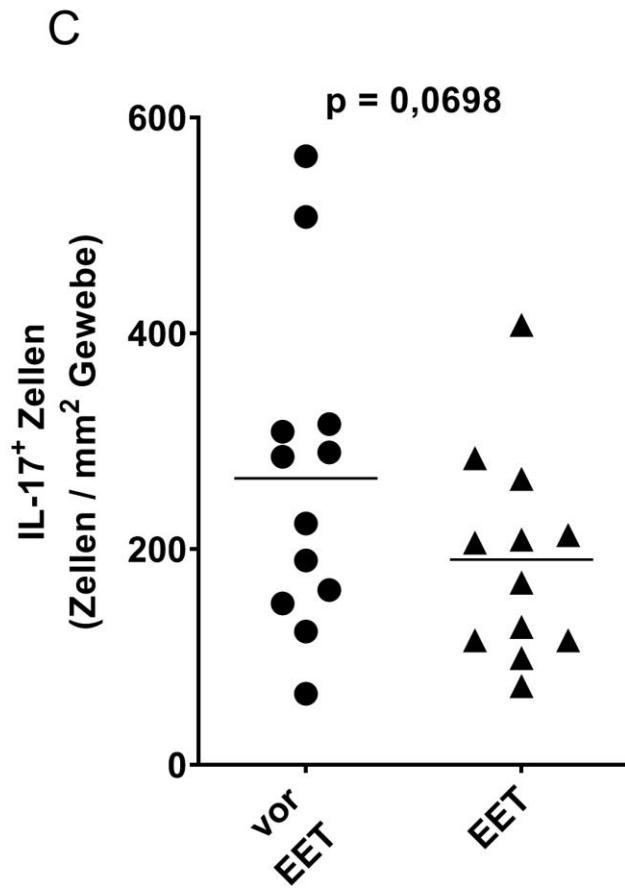
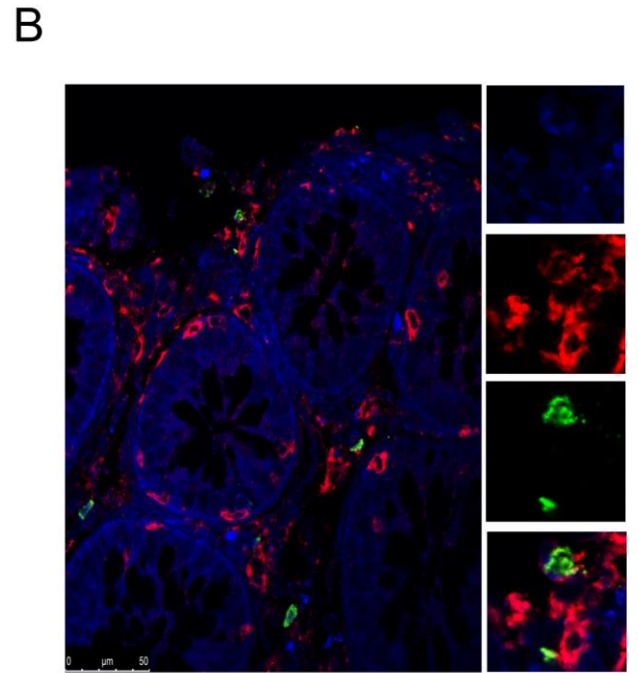
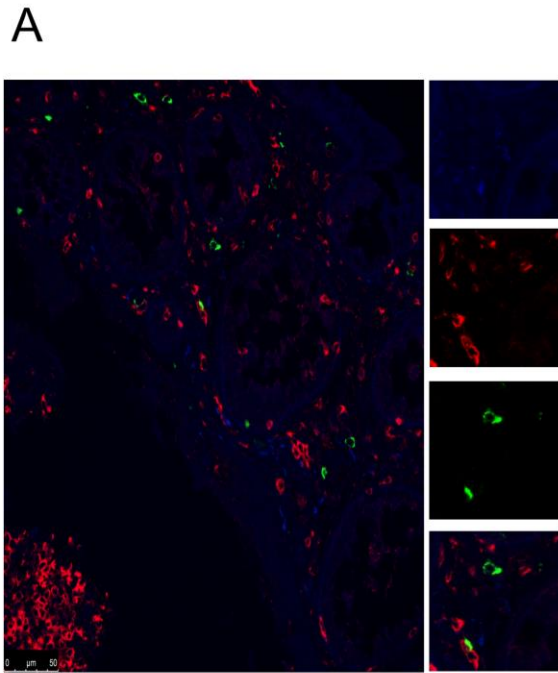
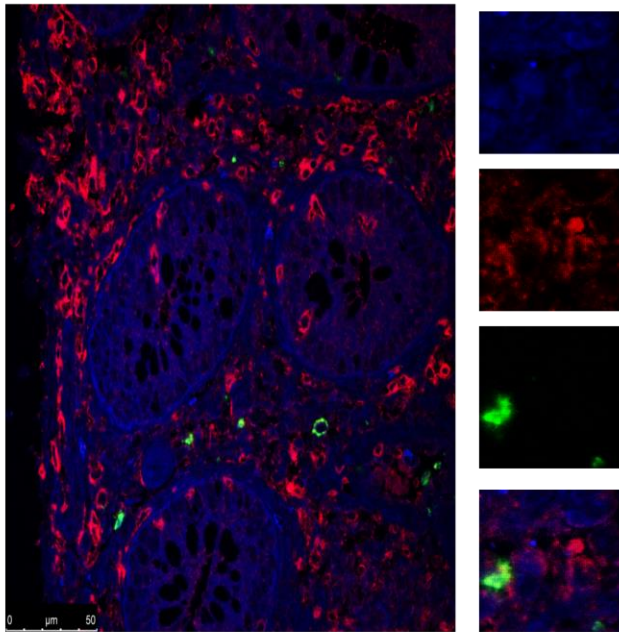


Abbildung 3.5.2.1 Entwicklung der Zahl der Th17-Zellen in der L. propria unter EET bei 12 Studienteilnehmern.

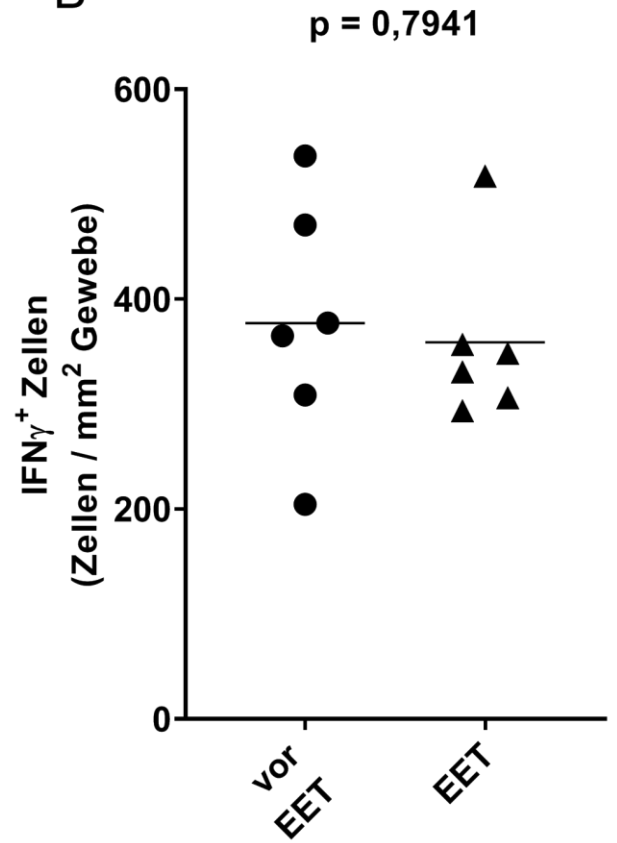
(A und B) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von CD3 und IL17 mittels unterschiedlichen anti-IL17-Antikörper ((A) Firma R&D Systems und (B) Firma Santa Cruz siehe auch Material und Methoden Teil) auf Colon descendens sowie auf Sigma. CD3 ist rot, IL-17 grün zugeordnet. Blau erscheinen die mit DAPI markierten Zellkerne. (C) Nicht-signifikanter Rückgang in der Zahl der IL17⁺Zellen und (D) gleichzeitig signifikante Abnahme der Zahl CD3 und IL-17 positiven Th17 Zellen. Den Symbolen entsprechen gemittelte Zellzahlen aus 5 untersuchten Bildarealen eines Schnittes, welcher evtl. mehrere Biopsien aus einer anatomischen Region umfasst, die vor- und unter EET gewonnen wurden. Die horizontalen Linien zeigen den jeweiligen Mittelwert.

Repräsentativ für die Untersuchung der Th1-Zellen wurde eine Färbung der Interferon-gamma (IFN γ) sezernierenden Zellen etabliert. Dafür wurden korrelierenden Biopsien einer anatomischen Lokalisation im Kolon von 6 der 12 Patienten mit einem anti-IFN γ -Antikörper gefärbt. Die Auswahl dieser 6 Patienten, sowie der Biopsie-Lokalisationen erfolgte zufällig. Die Zahl der IFN γ -produzierenden Zellen in der Lamina propria blieb im Verlauf von 3 Wochen EET konstant. Es zeigten sich weder Veränderungen in der absoluten Zellzahl IFN γ ⁺ Zellen, noch in der relativen Zellzahl bezogen auf CD3⁺ T-Zellen (*Abb. 3.5.2.2*).

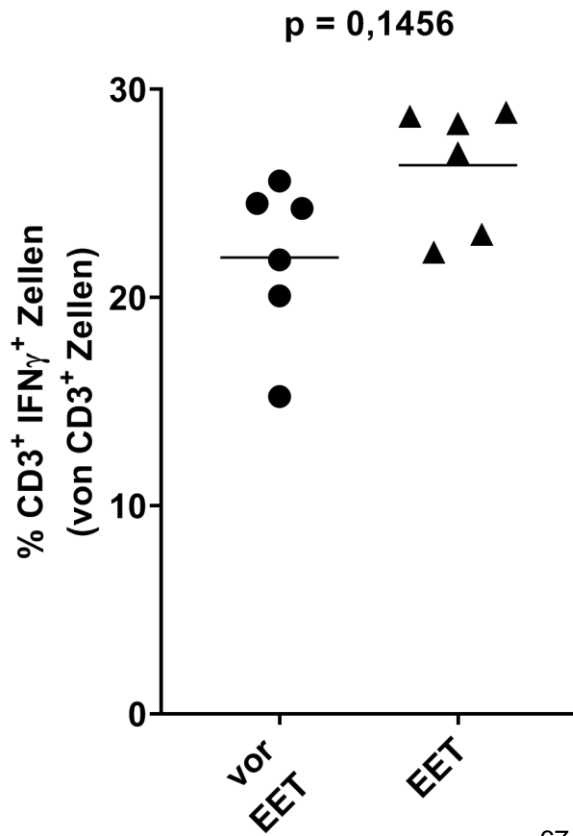
A



B



C



D

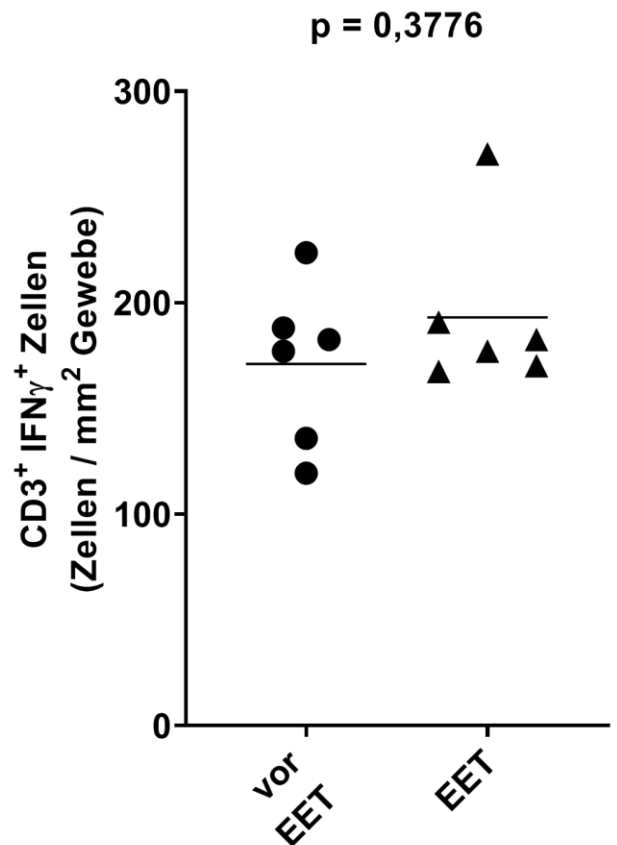
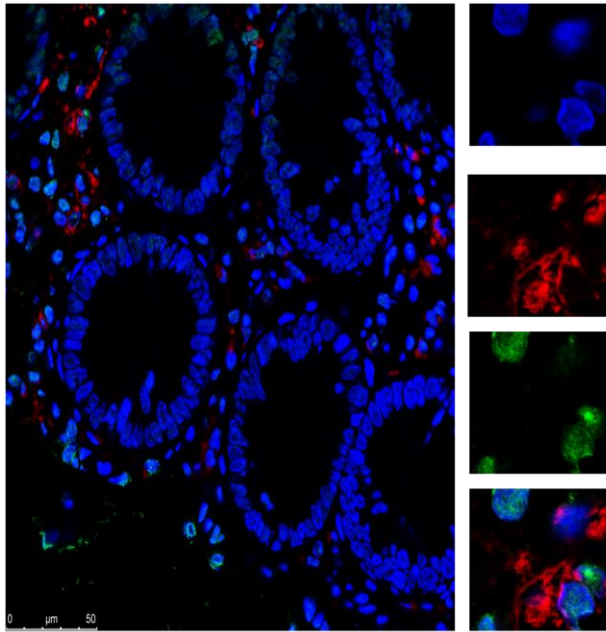


Abbildung 3.5.2.2 Konstante Zahl der IFN γ ⁺, sowie der IFN γ ⁺CD3⁺ T-Zellen in der Lamina propria unter EET.

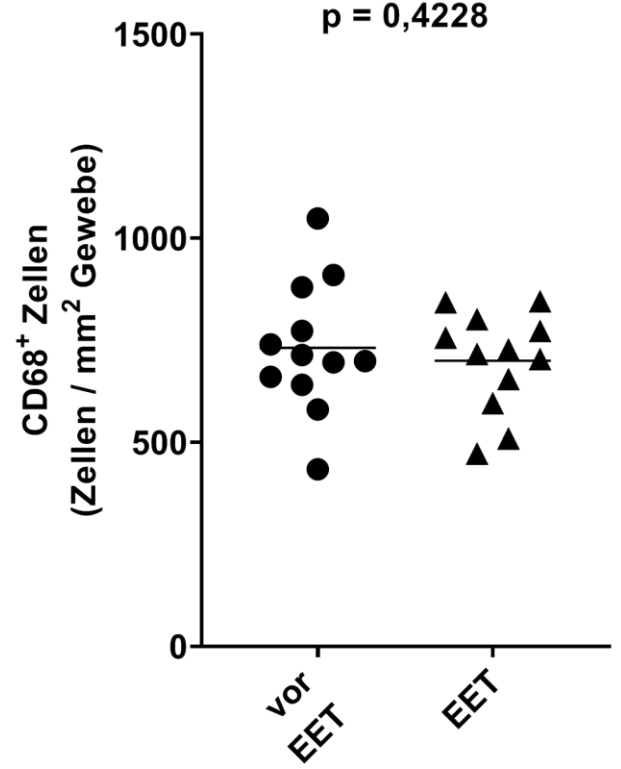
(A) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von CD3 und IFN γ auf Colon descendens. (CD3 ist rot, IFN γ grün zugeordnet. Blau erscheinen die mit DAPI markierten Zellkerne.) (B) Es ist keine signifikante Änderung in der Zahl der IFN γ sezernierenden Zellen unter EET zu erkennen. (C und D) Auch die Zahl der CD3⁺IFN γ ⁺ Th1-Zellen ändert sich (C) weder prozentual (D) noch absolut. Den Symbolen sind die Mittelwerte der Zellzahlen aller ausgewerteten Gesichtsfelder von mehreren Biopsien aus dem Kolon vor- und unter EET zugeordnet. Die horizontalen Linien zeigen den jeweiligen Mittelwert.

Neben den T-Zell Subpopulationen wurden auch die Zahl der Makrophagen in der Kolonschleimhaut bestimmt. Makrophagen wurden durch eine Färbung auf das Oberflächenprotein CD68 identifiziert. Die Zahl der Makrophagen in dem entzündlichen Infiltrat blieb konstant. Es konnten keine relevanten Veränderungen in der Zahl der CD68⁺ Zellen gezeigt werden (*Abb. 3.5.2.3*). Für diese Färbung wurden Biopsien der 12 Patienten aus den gleichen Darmabschnitten, wie für die CD3/IL17-Doppelfärbung verwendet. Im Rahmen dieser Färbung wurde zusätzlich (als zweite Färbung) ein TUNEL Assay durchgeführt, um eine Quantifizierung der apoptotischen Zellen in der Mukosa zu ermöglichen. Diese zeigte keine Veränderung in der absoluten Zahl apoptotischer Zellen in der Lamina propria. Wurden doppelgefärbte TUNEL⁺CD68⁺ Zellen untersucht, ergab sich auch hier kein Unterschied (*Abb. 3.5.2.3*).

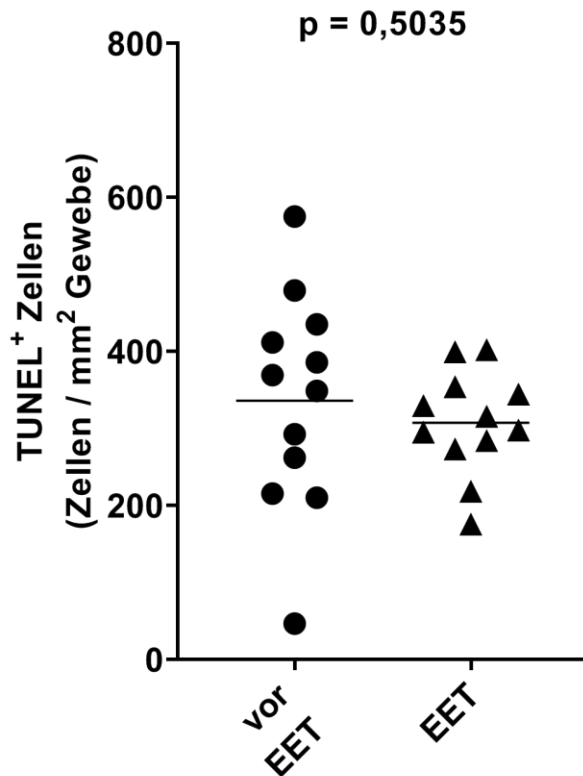
A



B



C



D

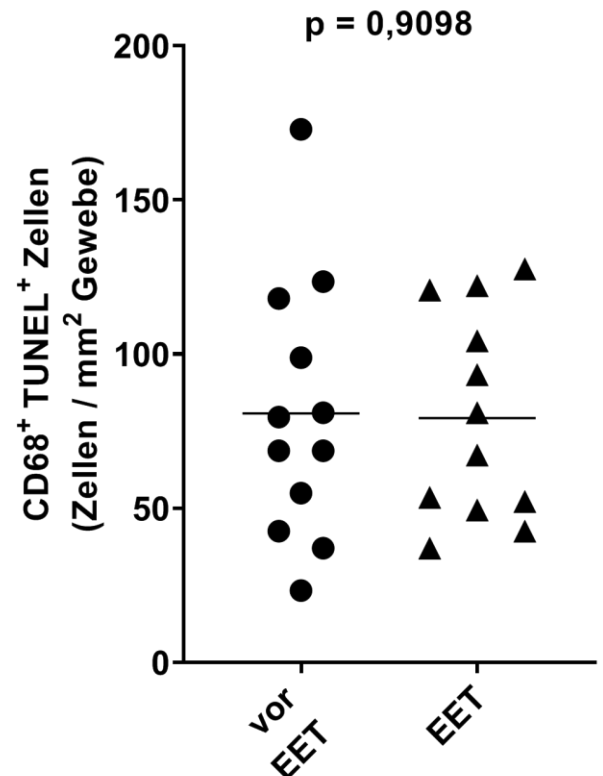


Abbildung 3.5.2.3 Keine relevante Änderung der Zahl der CD68⁺ Makrophagen, sowie der apoptotischen TUNEL⁺ Zellen nach drei Wochen EET.

(A) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von CD68 und TUNEL Assay auf Gewebe des C. sigmoideum. CD68 ist rot, TUNEL grün zugeordnet. Blau erscheinen die mit DAPI markierten Zellkerne. (B) Der geringe Unterschied in der absoluten Makrophagen-Zellzahl vor- und unter EET ist nicht signifikant. (C und D) Auch die Anzahl apoptotischer Zellen (C), sowie die doppelpositiven, apoptotischen Makrophagen (D) blieben unverändert. Den Symbolen sind die Mittelwerte der Zellzahlen aller ausgewerteten Gesichtsfelder von mehreren Biopsien aus korrespondierenden Kolonlokalisationen vor- und unter EET zugeordnet. Die horizontalen Linien zeigen den jeweiligen Mittelwert.

4. Diskussion

4.1 Übersicht über die klinisch-experimentellen Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit stellen Effekte exklusiver enteraler Ernährungstherapie auf die Immunregulation von Morbus Crohn bei pädiatrischen Patienten dar. Durch die Untersuchung pro- und anti-inflammatorischer Zellen der Darmmukosa, sowie im peripheren Blut, vor Beginn - und unter Ernährungstherapie, konnten Erkenntnisse über die Immunregulation bei der Remissionsinduktion gewonnen werden.

Im ersten Teil der Ergebnisse erfolgte die Charakterisierung der Studiengruppe. Fünfzehn pädiatrische Patienten sind in die Studie aufgenommen worden, bei denen im Durchschnittsalter von 12,4 Jahren die Diagnose Morbus Crohn klinisch, endoskopisch und histologisch gestellt wurde. Die Mehrheit der Patienten (>80%) litt unter einem disseminierten Befall des oberen und unteren Gastrointestinaltrakts und war Therapie-naiv zu Beginn einer ausschließlichen Ernährungstherapie. Zu diesem Zeitpunkt zeigten 27% der Patienten eine leichte, 53% eine mäßige und 20% eine schwere Krankheitsaktivität nach dem mathematisch gewichteten pädiatrischen Crohn Krankheitsaktivitätsindex (wPCDAI). Die Probeentnahmen (peripheres Blut und endoskopisch gewonnene Biopsien für die Histologie) erfolgten vor Beginn und im Durchschnitt am 25. Tag während der Ernährungstherapie.

Nach 3 Wochen EET konnte ein klinisches Ansprechen gezeigt werden. Die Reduktion der Krankheitsaktivität spiegelte sich in der signifikanten Abnahme des wPCDAI-Wertes um durchschnittlich 33,2 Punkte, wie auch in der Zunahme des alters- und geschlechtsspezifischen z-Scores für Gewicht um 0,18 wider. Auch laborchemisch war ein Rückgang der Entzündung deutlich zu erkennen. Dies äußerte sich in der signifikanten Abnahme (bis zur Normalisierung) der CRP und BSG Werte, Leukozytenzahl und Fibrinogenkonzentration, sowie im signifikanten Hämoglobinanstieg.

Die histopathologische Entzündungsaktivität zeigte sich bei der zweiten Biopsie noch nicht signifikant gebessert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Immunregulation im peripheren Blut, sowie in der Lamina propria vor- und unter (3 Wochen nach Beginn) einer EET charakterisiert. Hierfür wurden die Treg-Zellen und weitere Th-Subpopulationen anhand des surrogaten nukleären Transkriptionsfaktors Foxp3 oder anhand charakteristischer Oberflächenmoleküle (CRTH2, CCR6) oder Zytokinexpression (IL-17, IFN γ) untersucht. In der erweiterten Immunfluoreszenz-

Charakterisierung wurde die Zahl der Makrophagen (CD68⁺ Zellen) und der apoptotischen Zellen (TUNEL gefärbte Zellen) bestimmt.

Im peripheren Blut blieb nach 3 Wochen EET die absolute und auch die relative Anzahl der CD4⁺ Th-Zellen konstant, gleichzeitig stieg aber die absolute und relative Zahl der Treg-Zellen signifikant an. Zwischen der relativen Zahl der Treg-Zellen im peripheren Blut und dem wPCDAI konnte einen umgekehrt linearen Zusammenhang gezeigt werden. Auch die Treg-Zellen, welche das Integrin-Heterodimer $\alpha 4\beta 7$ exprimieren und ein *Gut-Homing* Potential haben, sind unter EET im peripheren Blut signifikant angestiegen. Die Zahl der CCR6-exprimierenden und der CRTH2-exprimierenden Zellen - auch der zusätzlich durch $\alpha 4\beta 7$ gekennzeichnete *Gut-Homing* Zellen – im peripheren Blut blieb konstant.

Die immunfluoreszenzhistochemische Charakterisierung der Zellen in der Lamina propria unter EET ergab eine signifikante Abnahme der Treg-Zellen, sowohl absolut als auch relativ. Zudem wurde eine signifikante Abnahme der CD3⁺IL17⁺ Zellen gezeigt. Keine signifikanten Änderungen wurden dagegen im Falle aller IL17⁺ -Zellen, der Makrophagen, sowie IFN γ -sezernierenden Zellen gefunden. Es konnte ebenfalls keine signifikante Änderung in Zahl der apoptotischen Zellen der Darmmukosa gesehen werden.

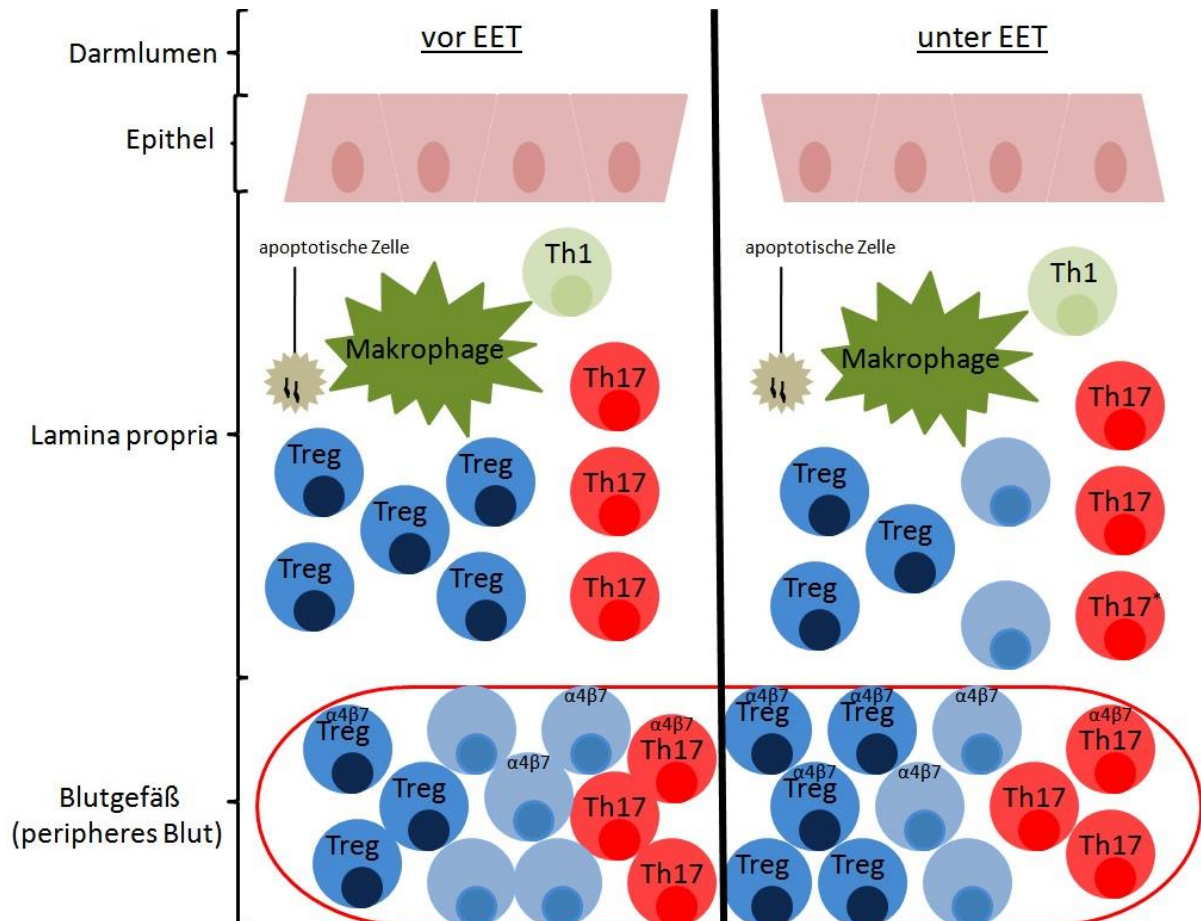


Abbildung 4.1.1 Zusammenfassende schematische Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie und der Immunfluoreszenzhistochemie.

Abnahme der Zahl der Treg-Zellen in der Lamina propria mit gleichzeitiger Zunahme im peripheren Blut, inklusive der Zahl der *Gut-Homing* Treg-Zellen. Keine Änderung in der Anzahl anderer Zellen. * Eine Änderung der Zahl der Th17 Zellen in der Lamina propria ist nicht sicher auszuschließen, da es zwar keine Abnahme aller IL17⁺ Zellen, wohl jedoch der CD3⁺IL17⁺ Zellen gezeigt werden konnte.

4.2 Interpretation der Ergebnisse vor dem Hintergrund der Literatur

4.2.1 Repräsentative Kohorten pädiatrischer Patienten mit Morbus Crohn

Insgesamt wurden 15 Patienten mit MC in die Studie untersucht. Reikvam et al. haben in einer ähnlichen Kohorte die Immunregulation des unbehandelten MC bei Kindern und Jugendlichen untersucht. Sie konnten 14 Patienten inkludieren [117]. Eine etwas größere pädiatrische Patientengruppe (n=20) ist in die Studie über der Immunregulation unter Infliximab von Kim et al. eingeschlossen worden [168]. Sowohl bei Reikvam et al. als auch in der Studie von Kim et al. wurden von allen Patienten Biopsien gewonnen. Im Vergleich weist unsere Studie mit einem kompletten Datensatz einschließlich Darmbiopsien vor und während EET bei nur 12 Patienten eine etwas kleinere Kohorte auf.

Mehr Jungen als Mädchen erkranken an Morbus Crohn. In einer Register-Studie (CEDATA-GPGE) waren 58% der neudiagnostizierten MC Patienten männlich [169]. Die Geschlechtsverteilung unserer Kohorte zeigte ebenfalls eine leichte Knabenwendigkeit mit 8 männlichen und 7 weiblichen Patienten.

Der Altersmittelwert der MC-Patienten der vorliegenden Arbeit war bei Erstdiagnose $12,4 \pm 2,9$, sowie bei Therapiebeginn $13,5 \pm 2,2$ Jahre. Laut gängiger Literatur liegt der Erkrankungsgipfel für MC im Alter zwischen 15 und 25 Jahren [1, 11]. Eine jüngere länderübergreifende europäische 5-Jahresanalyse von 2013 (EUROKIDS Register) zeigte jedoch ein Durchschnittsalter bei Erstdiagnose MC von $12,5 \pm 3,3$ Jahren [170]. In einer Register-Studie aus Deutschland waren die meisten Patienten bei Erstdiagnose zwischen 13 und 17 Jahren, das Altersmedian lag bei 13 Jahren [169]. Wittig et al. beschrieben bei Untersuchung der Inzidenzzahlen einer großen, deutschen Krankenkasse zwischen 2009 und 2012 ein Durchschnittsalter von 13,6 Jahren [7].

Im Anbetracht der aktuellen Datenlage, insbesondere in Europa und Deutschland, ist die vorliegende Studie trotz der niedrigen Teilnehmerzahl bezüglich des Patientenalters als repräsentativ zu werten.

Die Verteilung nach befallener Lokalisation im GIT in der vorliegenden Kohorte kann die aktuelle Statistik ebenfalls bestätigen, wonach die meisten MC-Patienten im Kindes- (>5 Jahre) und Jugendalter sowohl im distalen Ileum als auch im Kolon eine Inflammation aufweisen [3, 4, 170]. Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersuchten pädiatrischen MC-Patienten zeigen in zwei Dritteln ebenfalls einen ileokolischen Befall.

Die Schwere der Erkrankung zum Zeitpunkt der Studienrekrutierung wurde anhand des wPCDAI-Wertes dokumentiert. Die Teilnehmer unserer Studie hatten bei Aufnahme in die Studie entsprechend des wPCDAI eine moderate Krankheitsaktivität. Ähnlich zu unserer Studie wurde nur in der Studie von Kim et al. die Krankheitsaktivität entsprechend des wPCDAI analysiert und wies einen ähnlichen Mittelwert der Gesamtkohorte von "moderat bis schwer" auf [168]. Die im Durchschnitt moderate und damit signifikant erhöhte Krankheitsaktivität unserer Studienpatienten könnte den beschriebenen Ergebnissen unter Umständen besondere Aussagekraft verleihen, da die Effektivität der EET und deren Auswirkungen auf die Immunregulation trotzdem so deutlich zum Ausdruck kommen. Als Stärke hervorzuheben ist, dass 12 der 15 Patienten vor Beginn der EET therapienaiv waren (zwei Patienten waren fest eingestellt mit AZA, einer mit 5-ASA), während in der Kohorte untersucht von Kim et al. alle Patienten neben Infliximab auch mindestens ein weiteres Immunsuppressivum (AZA, Steroide oder 5-ASA) erhalten haben [168].

4.2.2 Klinischer Verlauf unter EET im Vergleich mit anderen konventionellen Therapieformen

Der Einfluss der EET auf die klinische Krankheitsaktivität war ein sekundärer Endpunkt der Studie. Der klinische Verlauf wurde anhand des wPCDAI, des Gewichts, sowie laborchemischer Parameter (CRP, BSG, Leukozytenzahl, Zahl der neutrophilen Granulozyten, Fibrinogen und Hämoglobin) bewertet. Bereits nach 3 Wochen unter EET konnte eine signifikante Besserung aller o.g. Parameter beobachtet werden. Damit bestätigt unsere Studie die Wirksamkeit einer EET als Induktionstherapie bei pädiatrischen Patienten mit aktivem MC. Die klinische Wirksamkeit der EET als Induktionstherapie, sowie zusätzlich die Gleichwertigkeit zur Steroidtherapie wurde auch in zwei großen Metaanalysen gezeigt [148, 153]. So haben Dziechciarz et al. in ihrer Metaanalyse insgesamt 11 randomisierte, kontrollierte Studien mit insgesamt 394 pädiatrischen MC Patienten unter EET oder Steroidtherapie untersucht. Kriterium für klinische Besserung war in den meisten dieser Studien die klinische Remission (definiert je nach Studie im Ausdruck der jeweiligen Indizes, wie PCDAI, CDAI und Lloyd-Still Index) in den Wochen 8, 9 oder 10 [148]. Da die vorliegende Arbeit auf die frühen Effekte der EET abzielte, war im Studiendesign keine Re-Evaluation in den Wochen 8-10 vorgesehen. Laut Dziechciarz et al. ist der PCDAI in vier zwischen EET und Steroidtherapie vergleichenden Studien ($n > 56$) und in drei ($n = 84$) unterschiedliche Formula vergleichenden Studien als Kriterium für die Therapiewirksamkeit verwendet worden und zeigte ebenfalls einen signifikanten Rückgang beim Kontrollzeitpunkt nach 8, 9 oder 10 Wochen. Die meisten randomisierten klinischen Studien berichten jedoch über eine Remission unter EET bereits im ersten Monat, so zum Beispiel nach 2,5 Wochen beziehungsweise 11,1 Tagen [148, 171, 172]. Auch Borrelli et al. berichten über schnell sinkende Entzündungswerte nach zwei Wochen EET, die danach jedoch über eine lange Zeit stagnieren [149]. Die offene, randomisiert kontrollierte Studie von Borrelli et al. verglich therapienaive pädiatrische Patienten mit aktivem MC unter EET mit solchen, unter Steroiden als Induktionstherapie über 10 Wochen, führte aber alle 2 Wochen Kontrollen des PCDA-Indexes, sowie Laborparameter (u.a. CRP) durch. Somit sind die Veränderungen dieser Parameter bis Woche 2 und 4 vergleichbar mit den Veränderungen in der vorliegenden Arbeit. Hierbei ist der PCDAI im Durchschnitt bei Patienten unter EET bereits nach zwei Wochen von etwa 39 auf etwa 21, sowie nach weiteren zwei Wochen auf etwa 13 gesunken. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit dem Rückgang des wPCDAI-Index nach etwa 3 Wochen EET von im Durchschnitt 48,5 auf 18,0 Punkte, der im Rahmen unserer Studie beobachtet wurde. Die rückläufigen CRP- und BSG-Werte (im Durchschnitt von 2,00 mg/dl auf 0,56 mg/dl, sowie 30 mm/h auf 22 mm/h) zeigen in der Studie von Borrelli et al. insgesamt höhere Ausgangswerte, die in der Tendenz jedoch vergleichbar schnell senkend beobachtet wurden, von 11 mg/dl auf 3 mg/dl nach 2 Wochen und BSG von 45 mm/h gesunken auf 21 mm/h [149]. Zahlreiche weitere Studien

haben im Einklang mit den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit rückläufige Krankheitsaktivitäten bei pädiatrischen Patienten mit MC unter EET als Induktionstherapie bewiesen [148].

Der in dieser Arbeit beobachtete klinische Verlauf unter EET mit rückläufigen systemischen Entzündungsparametern scheint also insgesamt im Einklang mit dem in der Literatur unter EET zu sein.

4.2.3 Veränderungen des intestinalen und systemischen Immunzellkompartments bei kindlichem MC unter EET

Um die Immunregulation des pädiatrischen MC unter EET zu untersuchen haben wir die quantitativen Veränderungen der Th-Zellgruppen, besonders der Foxp3⁺ Treg-Zellen in der entzündeten Lamina propria und gleichzeitig im peripheren Blut untersucht. Hierbei konnte nach 3 Wochen EET eine signifikante Abnahme Foxp3⁺ Treg-Zellen in der Lamina propria und eine signifikante Zunahme dieser Zellen im peripheren Blut gesehen werden. Um weitere Erkenntnisse zu gewinnen, wurde der Anteil von zusätzlich durch heterodimere $\alpha 4\beta 7$ -Integrin gekennzeichneten (*Gut-Homing*) Treg-Zellen im peripheren Blut charakterisiert. Hierbei ist eine signifikante Zunahme sowohl der Foxp3⁺ Zellen unter allen *Gut-Homing* Zellen, als auch die $\alpha 4\beta 7^+$ Foxp3⁺ Treg-Zellen unter allen Foxp3⁺ Zellen beobachtet.

Die wichtige funktionelle Rolle der Treg-Zellen in der Pathogenese von CED, insbesondere auch von pädiatrischen MC ist Thema vieler, zum Teil laufender Studien. Eastaff-Leung et al. haben im Jahr 2010 Th-Zellen von 63 Erwachsenen CED-Patienten und 28 gesunden Kontrollpersonen im peripheren Blut mittels FACS-Analyse, sowie in der Mukosa mittels RT-PCR (*Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) charakterisiert. Hierbei fanden sie bei CED-Patienten signifikant erniedrigte Zahlen an Treg-Zellen im peripheren Blut, sowie signifikant erhöhte Expression von den Treg-spezifischen Transkriptionsfaktor Foxp3 in der Lamina propria [113]. Dies entspricht der hier beschriebenen Situation vor EET. Obwohl Treg-Zellen in der FACS-Analyse beider Arbeiten als CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ definiert worden sind, haben Eastaff-Leung et al. im peripheren Blut von Patienten mit aktivem MC im Durchschnitt 6 ± 1 Treg-Zellen/ μ l Blut bestimmt, während diese Zahl in vorliegender Arbeit 42 ± 18 / μ l Blut war [113]. Der deutliche Unterschied liegt am ehesten an der unterschiedlichen Patientenpopulation (Kinder versus Erwachsene) und möglicherweise auch an unterschiedlichen Gating-Strategien. Es ist anzunehmen, dass Eastaff et. al., um mit großer Sicherheit alle nicht kontinuierlich Foxp3-exprimierende Th-Zellen (sogenannte transiente Treg-Zellen) [173, 174] auszuschließen, ein sehr schmales Gate gesetzt haben. In einer pädiatrischen therapienaiven MC-Kohorte beschrieben Zhu et al. 30 ± 12 Treg-Zellen/ μ l Blut

[175]. Diese Ergebnisse gleichen denen vorliegender Arbeit. In der gleichen Studie von Zhu et al. wurden 60 ± 25 Treg-Zellen/ μl bei pädiatrischen Kontrollpatienten bestimmt [175]. Die deutlich niedrigere Zahl bei pädiatrischen Patienten mit aktivem MC, beschrieben in vorliegender Dissertation ist somit im Konsens der Erkenntnisse der Literatur. Nach meiner Kenntnis gibt es bis dato, neben vorliegender Arbeit keine weiteren Studien, die das quantitative Verhalten Foxp3⁺ Treg-Zellen im peripheren Blut unter EET untersuchen. In einer aktuellen Studie von 2019 haben Chiba et al. die signifikante Zunahme von Foxp3⁺ Treg-Zellen im peripheren Blut nach 2 Wochen Therapie mit anti-TNF-Antikörpern beschrieben [176]. Gleichzeitig wurde die Wirksamkeit der Therapie anhand gebesserten CDAI Werten festgestellt. Zudem gilt die Wirksamkeit einer Therapie mit anti-TNF-Antikörpern in zahlreichen Studien bewiesen und im klinischen Alltag fest etabliert [136-140]. In einer weiteren Studie vom April 2020 haben Vitale et al. bei 16 pädiatrischen MC Patienten unter klinischer Krankheitsremission (unabhängig von der Therapie) eine Zunahme CD4⁺Foxp3⁺ Zellen im peripheren Blut beschrieben [177]. All diese Ergebnisse sind im Einklang mit vorliegender Studie, in der bereits nach 3 Wochen EET eine Zunahme Foxp3⁺ Treg-Zellen im peripheren Blut beschrieben wurde.

Um weitere Erkenntnisse zu gewinnen, wurde in vorliegender Studie der Anteil von zusätzlich durch $\alpha 4\beta 7$ -Integrin gekennzeichneten (*Gut-Homing*) Treg-Zellen im peripheren Blut, sowie Treg-Zellen (im Allgemeinen) am Ort der Entzündung, in der Lamina propria charakterisiert. Treg-Zellen in der Darmmukosa von neudiagnostizierten pädiatrischen MC-Patienten wurden in einer jüngeren Studie von 2018 von Cho et al. untersucht. Hierbei war die Zahl der Foxp3⁺ Treg-Zellen in der Lamina propria des terminalen Ileums von 12 neudiagnostizierten pädiatrischen MC Patienten signifikant höher als im Falle 7 gesunder pädiatrischer Probanden [178]. Dies ist im Einklang mit der, in der vorliegenden Arbeit gesehenen, höheren Zahl Foxp3⁺ Treg-Zellen in der Lamina propria vor EET als nach 3 Wochen EET, wenn der Abfall der Foxp3⁺ Treg-Zellen unter EET als Trend zur Normalisierung angenommen wird. Reikvam et al. haben in ihrer pädiatrischen CED Kohorte (n=14) als Vergleich neben 16 Kindern mit einer nicht-CED-Diagnose auch 12 Erwachsene mit MC und 14 nicht-CED-Patienten im Erwachsenenalter untersucht [117]. Sie haben einen deutlichen Anstieg der Treg-Zellen in der Lamina propria bei CED Patienten gegenüber von nicht-CED Patienten gefunden, sowie insgesamt höhere Zahlen bei pädiatrischen Patienten [117]. Dies unterstreicht die Rolle immunmodulatorischer Treg-Zellen in der Pathogenese von MC im Kindesalter. Die vor einer EET bestimmten Treg-Zellzahlen in pädiatrischen Patienten mit aktiven MC sind den von Reikvam et al. gesehenen Werten sehr ähnlich (bei durchschnittlich etwa 100 Zellen/ mm^2) [117]. Auch die Zahl aller Pan-T-Zellen (CD3⁺) sind vergleichbar. Wir definierten Treg-Zellen als CD3⁺Foxp3⁺, wogegen Reikvam et al. Foxp3⁺CD25⁺ oder Foxp3⁺CTLA4⁺ (*Cytotoxic T-*

lymphocyte antigen 4) als Marker benutzte. Die Zahl doppelt positiver Zellen, und damit mit großer Wahrscheinlichkeit Treg-Zellen entsprechend, scheint im Falle aller dieser Färbungen etwa gleich zu sein [117]. Um zusätzlich einige CD8⁺-Zellen, die ebenfalls Foxp3⁺ sein können, auszuschließen, wäre eine CD4/Foxp3 Doppelfärbung noch mehr passend, diese weist jedoch – wie auch im Fall dieser Promotionsarbeit – eine geringere Spezifität bei Doppelfärbungen auf und erschwert eine einwandfreie Quantifizierung. Über die Zahl miterfasster CD8⁺Foxp3⁺-Zellen sowie transient Foxp3-exprimierender Zellen kann diese Dissertation keine Aussage machen.

Vorliegende Arbeit konnte nach 3 Wochen EET gleichzeitig die signifikante Abnahme Treg-Zellen in der Lamina propria und die signifikante Zunahme $\alpha 4\beta 7^+$ Foxp3⁺ Treg-Zellen im peripheren Blut zeigen. Gleichzeitig konnte laborchemisch ein Rückgang der Entzündungsparameter gesehen werden. Wahrscheinlich führt die reduzierte Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren unter EET wie TNF oder Chemokine zu einer geringeren Rekrutierung von Treg-Zellen in die Lamina propria. Alternativ könnte die verminderte Zahl an Treg-Zellen in der Lamina propria unter EET durch eine erhöhte Apoptose bedingt werden, da pro-inflammatorische Zytokine ein wichtiges Überlebenssignal von Treg-Zellen in der Lamina propria darstellen [178]. Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Zahl apoptotischer Zellen in der Lamina propria vor- und 3 Wochen nach EET. Zudem konnte diese Arbeit im peripheren Blut unter EET eine signifikant erhöhte Zahl der $\alpha 4^+\beta 7^{\text{high}}$ *Gut-Homing* Zellen im Allgemeinen aber insbesondere der $\alpha 4^+\beta 7^{\text{high}}$ Foxp3⁺ *Gut-Homing* Treg-Zellen zeigen. Diese Beobachtungen verstärken die erstere Hypothese und sind im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Hypothese, dass durch entzündungsfördernde oder -hemmende Prozesse Treg-Zellen im Darm rekrutiert oder wieder in das periphere Blut abgegeben werden [179, 180].

Obwohl die Pathogenese des MC noch nicht vollständig erforscht ist und multifaktoriell zu sein scheint, wird bei der Krankheitsentstehung als Hauptfaktor eine gestörte Homöostase zwischen den pro-inflammatorischen Th17-Zellen, bzw. ihrer ebenfalls entzündungsfördernden Zytokinen und den immunmodulierenden Treg-Zellen vermutet (siehe Kapitel 1.1.3). Deshalb wurden im Rahmen der weiteren Charakterisierung der Th-Zellsubpopulationen die Th17-Zellen in der entzündeten Lamina propria und gleichzeitig Zellen der Th17 pro-inflammatorischen Immunantwort (durch CCR6 gekennzeichnet) im peripheren Blut untersucht. Hierbei konnten keine signifikanten Veränderungen gefunden werden, wobei in der Lamina propria die Zahl CD3⁺IL17⁺ Zellen signifikant abgenommen hat bei gleichbleibender Zahl aller IL17⁺ Zellen. Dieser Befund ist nicht eindeutig durch eine alleinige

Abnahme der Th17 Zellen zu erklären, vor allem im Anbetracht der gleichbleibenden Zellzahl im peripheren Blut und der unveränderten Zahl apoptotischer Zellen in der Lamina propria. Zu betonen ist zudem, dass die immunhistochemischen Analysen bereits nach 3 Wochen EET erfolgten, um die Prozesse früher Immunveränderungen unter EET zu erkennen. Es ist nicht auszuschließen, dass nach längerer Zeit unter EET auch im Bereich dieser Zellen quantitative Unterschiede zu verzeichnen wären.

Aktuelle Erkenntnisse über Th17-Zellen deuten zwar auf eine wichtige Rolle in der Pathogenese von MC hin (siehe Kapitel 1.1.3), genaue Aussagen über quantitative Veränderungen unter Therapie im peripheren Blut und in der Lamina propria existieren nach meinem Kenntnisstand bis dato nicht. U.a. haben Eastaff-Leung et al. die Zahl der Th17 Zellen mittels FACS im peripheren Blut, sowie das Ausmaß der IL-17-Expression in Darmbiopsien mittels RT-PCR untersucht und bei 63 Patienten mit aktiver CED im Vergleich zu 28 Kontrollpatienten beides erhöht gefunden [113]. Die Ratio der Treg-Zellen zu den Th17-Zellen im peripheren Blut bei Erwachsenen Patienten mit aktivem MC war im Durchschnitt $0,55 \pm 0,07$ [113]. Im Rahmen vorliegender Arbeit wurde vor Beginn einer EET eine ähnliche Treg/Th17-Ratio bei pädiatrischen Patienten gefunden, nämlich $0,56 \pm 0,23$. Im Gegensatz zu Eastaff-Leung et al. wurden Zellen der Th17 vermittelten Immunantwort in der FACS-Analyse vorliegender Studie mit Hilfe des Oberflächenmoleküls CCR6 (und nicht durch Zytokine zugeordnete Marker) unter allen Th Zellen ($CD3^+CD4^+$) identifiziert. Somit wurde die Gefahr, die Anzahl der Th-Zellen durch unspezifische Stimulation in einer nicht (patho-) physiologische Weise zu beeinflussen umgangen, gleichzeitig jedoch in Kauf genommen, dass der Anteil der Th17-Zellen möglicherweise überschätzt wurde, da nicht alle CCR6-positiven Zellen auch IL-17 produzieren. Immunfluoreszenzhistochemisch würde sich noch eine spezifische Identifizierung der Th17-Zellen mittels einer nukleären Färbung für den Transkriptionsfaktor ROR γ t anbieten. Diese Färbung konnte ich aber leider zu Beginn meiner Arbeit in unserem Labor nicht etablieren. Dieser Umstand erschien uns mit mehr Ungenauigkeit in der Bestimmung der Th17-Zellen einherzugehen als eine Doppelfärbung mit CD3 und IL-17, wo ein Anteil von natürlichen T-Killerzellen eventuell fälschlicher Weise für eine Th17-Zelle gehalten werden. Weiterhin wäre im Anbetracht der Übersichtsarbeit von Shingo et al. zu bedenken, dass Th-Zellen mehrere Haupttranskriptionsfaktoren exprimieren können, so vor allem Treg-Zellen, die gleichzeitig Foxp3 und ROR γ t positiv sein könnten [174]. Somit könnten in der Immunfluoreszenzfärbung ROR γ t positive Zellen zum Teil nicht eindeutig Th17-Zellen zugeordnet werden, wobei laut Voo et al. diese Zellen auch CCR6 positiv sind und IL-17 produzieren, gleichzeitig aber auch immunsuppressiv wirken können [124]. Somit könnten solche Zellen – wenn auch in einem wahrscheinlich nur sehr geringen Anteil – auch mit den in dieser Arbeit verwendeten Färbemethoden gleichzeitig als Treg – und als Th17-Zellen

identifiziert worden sein. Die genaue Funktion solcher Zellen und im welchem Ausmaß sie bei aktivem MC vorkommen, müssen noch erforscht werden.

Andere IL-17 exprimierende Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen und Monozyten, sind nicht CD3, sondern CD68 positiv, was auch Fujino et al. betrachtet haben, in dem sie alle IL-17 produzierende Zellen unter den CD3 und den CD68 positiven Zellen gesucht haben. Auch vorliegende Arbeit hat im Rahmen der erweiterten Charakterisierung der Immunzellen der Lamina propria eine vergleichende (vor- und unter EET) Quantifizierung der CD68 positiven Zellen durchgeführt. Von dieser erhofften wir zusätzliche Informationen über die Immunvorgänge unter EET, denn gerade am Anfang eines aktiven MC wurde von Kugathasan et al. eine ausgeprägte Th1-Antwort beschrieben, die sich dann zunehmend in eine Th17-gesteuerte Antwort wandeln soll [91]. Als ein weiterer Marker für die Th1-Antwort wurde in dieser Arbeit eine Quantifizierung der IFN γ -produzierenden Zellen in der Lamina propria vor und unter EET bei der Hälfte der Patienten bestimmt. Diese wurden in weiteren Studien, wie von Fuss et al. und Parronchi et al. im Vergleich zu gesunden Probanden bei Patienten mit MC deutlich häufiger nachgewiesen [85, 88]. Das primäre Ziel dieser Arbeit war jedoch nicht der Vergleich zu Kontrollpersonen, sondern die Beobachtung von Veränderungen unter EET. Als weitere Charakterisierung der Th-Subgruppen wurden die CRTH2-markierten Zellen im peripheren Blut vor- und unter EET als Ausdruck der, durch Th2-Zellen vermittelten pro-inflammatorischen Immunvorgängen untersucht. Hier wurden jedoch keine signifikanten Veränderungen gefunden. Zusätzlich wurde im Rahmen vorliegender Promotionsarbeit der Anteil der $\alpha 4\beta 7$ positiven Zellen unter den CCR6 positiven Zellen bestimmt. Hierdurch sollten, im Anbetracht neuer Erkenntnisse über das sogenannte *Lymphozyten-Homing* (Migration der Effektorzellen aus dem peripheren Blut in die Lamina propria), u.a. diejenigen Th17-Zellen identifiziert werden, die auch vor Ort der Inflammation potentiell von Bedeutung sind [58]. Dabei könnten neue Therapieansätze entstehen, wenn eine kausale Rolle der *Gut-Homing* Zellen nachgewiesen werden könnte.

Anhand der vorhandenen Literatur sind sowohl Th17-, als auch andere IL-17-produzierende und auch Th1-Zellen von Bedeutung in der Pathogenese von MC im Kindesalter, weshalb vorliegende Dissertation von der Charakterisierung dieser Zellen im peripheren Blut und in der Mukosa vor- und unter EET bei pädiatrischen MC-Patienten neue Erkenntnisse erhofft hat. Es konnten jedoch keine signifikanten quantitativen Änderungen nach 3 Wochen EET im Bereich dieser Zellen gefunden werden. Die Aussage dieser Befunde kann durch die teilweise nur unzureichend spezifischen Färbungen hinterfragt werden und muss in künftigen Studien weiter untersucht werden.

4.2.4 Veränderungen des Immunzellkompartments bei MC unter EET im Vergleich mit direkt immunmodulatorischen Therapieformen

Ziel vorliegender Promotionsarbeit war, neue Erkenntnisse über die Immunregulation von Morbus Crohn im Kindes- und Jugendalter unter einer exklusiven enteralen Ernährungstherapie zu gewinnen. Hierfür wurden pro-inflammatorische und immunmodulierende Zellreihen im peripheren Blut und in der Lamina propria vor-, sowie etwa 3 Wochen nach Beginn einer EET, wie bereits oben (siehe auch 4.2.3) beschrieben, untersucht. Nach meiner Kenntnis existierten zu Beginn der vorliegenden Arbeit keine anderen Studien mit gleichem Fokus. Bereits mehrere Arbeitsgruppen haben Charakterisierungen der Immunregulation im Rahmen unterschiedlicher Therapien vergleichend in zum Teil auch pädiatrischen Patienten mit aktiver CED und Kontrollpersonen durchgeführt. Studien über die Veränderungen von TH17- und Treg-Zellen existieren nach meinem Wissen nur unter Anti-TNF-Antikörper-Therapie, nicht aber unter EET. Gleichwohl gilt die Wirksamkeit beider Therapieformen für die jeweilige Indikationen als bewiesen.

Diese Promotionsarbeit hat unter EET in pädiatrischen MC-Patienten vor allem Änderungen der Zahl der Treg-Zellen, sowohl in der Mukosa als auch im peripheren Blut nachweisen können. Unter EET konnte eine signifikante Zunahme der CD25^{high}Foxp3⁺-T-Zellen, die als Treg-Zellen definiert sind, im peripheren Blut gezeigt werden. Der Anteil an *Gut-Homing* Treg-Zellen ist ebenfalls signifikant angestiegen. Gleichzeitig konnte eine signifikante Abnahme der als CD3⁺Foxp3⁺ identifizierten Treg-Zellen in der Lamina propria nachgewiesen werden.

Betrachten wir, die in 4.2.3 aufgestellte Hypothese, wonach mit abnehmender Entzündung (wie wir es anhand der Krankheitsaktivität und anderer Entzündungsparameter unter EET feststellen konnten) die starke Präsenz der Treg-Zellen am Ort der Entzündung nicht mehr als Gegenpol zu den pro-inflammatorischen Zellen benötigt wird und die Treg-Zellen in den Pool der Tregs in das periphere Blut zurückkehren, oder aber nicht mehr aus dem Blut in die Darmmukosa rekrutiert werden, da entsprechende Mediatoren nicht mehr in hohem Ausmaß freigesetzt werden, müssen wir eine vermehrte Apoptose unter EET ausschließen [179, 180]. Veltkamp et al. berichten jedoch über eine signifikante Abnahme der apoptotischen Treg-Zellen sowohl im peripheren Blut als auch in der Mukosa bei abnehmender Entzündung unter Anti-TNF-Antikörpertherapie [118]. Ob der Grund dieser unterschiedlichen Ergebnisse in der Qualität der Färbung oder dem Zeitpunkt der Kontrolle liegt, oder ob es sich hierbei tatsächlich um einen unterschiedlichen Effekt der zwei Therapieformen handelt, kann Anhand vorhandener Daten nicht beantwortet werden. Dennoch ist auch zwischen zwei obigen Hypothesen bezüglich der Migration der Treg-Zellen am ehesten ein Zusammenspiel beider Effekte zu vermuten, was in weiteren Untersuchungen genauer untersucht werden muss.

Mehrere Studien konnten in der Zahl der Treg-Zellen ähnliche Beobachtungen unter einer Anti-TNF-Antikörpertherapie machen, so auch in zwei Erwachsenen CED-Kohorten mit insgesamt 65 Patienten von Boschetti et al. und Li et al., sowie Ricciardelli et al. im Falle von 7 Kindern mit MC unter Infliximab-Therapie [115, 116, 181]. In der pädiatrischen Kohorten wurden neben den 7 Patienten, die mit Infliximab therapiert wurden, auch 4 nicht-CED-Patienten, sowie 5 Patienten die EET, AZA, 5-ASA oder eine Kombination dieser Therapien erhalten haben mit eingeschlossen [181]. Diese wurden jedoch viel mehr als Kontrolle den Patienten unter Infliximab entgegengestellt und es sind der Studie keine Erkenntnisse bezüglich der Anzahl der Treg-Zellen unter EET zu entnehmen [181]. Die Hypothese von Ricciardelli et al., nach der TNF eine Hauptrolle in der Immunmodulation des adaptiven enteralen Immunsystems spielen könnte, kann insofern in Frage gestellt werden, dass vorliegende Studie ein ähnliches Verhalten der Treg-Zellen unter EET, also ohne TNF-Blockade zeigen konnte [181]. Zum Widerlegen dieser Hypothese, hätte aber im Rahmen vorliegender Dissertation gleichzeitig auch die Expression von TNF in der Darmmukosa und im peripheren Blut bestimmt werden können, denn ob auch eine EET unter Umständen eine direkt oder indirekt, gegen TNF gerichtete Wirkung haben könnte ist anhand der gewonnenen Daten nicht auszuschließen. So konnten Schwerd et al. in einer Studie - deren Teil auch diese Dissertation war - zeigen, dass PBMCs, gewonnen unter EET auf Stimulation mit LPS oder Flagellin signifikant weniger inflammatorische Zytokine, wie IL-6, IL-8, IL-1 β und IFN γ , nicht jedoch TNF und IL-17 sezernieren [182]. Dennoch scheint – in Anbetracht der Literatur über die Umwelt -, vor allem mikrobiombedingte Pathogenese von MC [26, 45-48, 50, 51, 57, 183, 184] – viel wahrscheinlicher zu sein, dass die geringere enterale Antigenexposition unter EET zu einer „Schonzeit“ des enteralen Immunsystems führt, während der dieses sich regenerieren und die Balance zwischen Abwehr und Immuntoleranz wiederherstellen kann [162, 165]. Diese Hypothese zu konkretisieren und zu verstärken, müssen weitere Untersuchungen folgen.

Die beobachtete Veränderungen in der Zahl Treg-Zellen in der Lamina propria, beziehungsweise im peripheren Blut unter anti-TNF, aber auch EET wurden in mehreren Studien mit *Mucosal Healing* in Zusammenhang gebracht [14, 151, 152, 185]. Auch die direkten Effekte einer EET auf die Treg-Zellen, wie in vorliegender Studie beschrieben, unterstützen diese Beobachtungen. Die gesehene Tendenz der gebesserten histopathologischen Krankheitsaktivitätsindexes spricht ebenfalls hierfür. Es ist anzunehmen, dass diese Besserung im Falle einer Kontrolle zu einem späteren Zeitpunkt signifikant wäre.

Die Annahme, dass unter Immunmodulation sich gleichzeitig zu den quantitativen Veränderungen der Treg-Zellen die Zahl der Th17-Zellen umgekehrt proportional ändert, wird durch die vorliegende Arbeit widerlegt, denn weder im peripheren Blut (hier nur CCR6-positive

Th-Zellen) noch in der Mukosa konnten signifikante Unterschiede gezeigt werden. Auch Zellen die u.a. die Th1-Immunantwort umfassen, haben sich in der Lamina propria quantitativ nicht verändert. Literatur, die sich mit den intestinalen Immunveränderungen im Rahmen einer therapierten CED befasst, gibt ebenfalls wenig Auskunft über diese Zellreihen, wenngleich sie in zahlreicher Literatur zur Pathogenese untersucht werden [26, 31, 113, 115, 116, 181]. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann die Hypothese aufgestellt werden, dass eine quantitative Änderung der Th17- und Treg-Zellen erst später im Verlauf unter der Therapie zu messen ist. Hierfür müssten erneute Vergleichsproben etwa 8 Wochen nach Beginn einer EET analysiert werden. Vielmehr gehen wir davon aus, dass die Th17- und Th1-Immunantworten zwar ausschlaggebend für die Entzündung sind, diese jedoch nicht primär steuern, sondern in Abwesenheit, bzw. Unterzahl der Treg-Zellen überschießend stimulieren. Für diese Hypothese sprechen verschiedene andere Studien, die eine Schlüsselrolle von Treg-Zellen im Rahmen der Immunmodulation beschreiben [26, 31, 115-117, 174, 186]. Hierfür spricht auch unsere Beobachtung, dass bei gleichbleibender Zahl der CCR6⁺-Zellen, bzw. aller T-Lymphozyten, die Treg/Th17-Ratio unter EET einen zur Krankheitsaktivität umgekehrt linearen Trend zeigt und ansteigt.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Dissertation ähnliche immunologische Vorgänge unter EET wie unter der etablierten und hoch-effektiven Induktionstherapie mit anti-TNF-Antikörpern gezeigt werden, die die Rolle von Treg-Zellen in der Immunregulation bei CED hervorheben. Weiterführende Forschung zu diesem Thema ist dringend notwendig, um die Wirkmechanismen der EET im Detail aufzuklären und künftig Kindern mit MC eine ebenso wirksame und nebenwirkungsarme, aber weniger belastende Therapie mittels Ernährungsintervention zu ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen und deren Besonderheiten in pädiatrischen Patienten sind Thema laufender Forschung. Ziel dieser Promotionsarbeit war es, mehr Erkenntnis über die Immunregulation bei aktivem kindlichen Morbus Crohn unter enteraler Ernährungstherapie zu gewinnen.

In einer prospektiven pädiatrischen Kohorte von 15 Patienten mit Morbus Crohn wurden vor, und 3 Wochen nach Beginn einer exklusiven enteralen Ernährungstherapie neben der klinischen Krankheitsaktivität die Anzahl regulatorischer, sowie pro-inflammatorischer Th-Zellen im peripheren Blut und in der Lamina propria bestimmt. Hierfür wurden ausführliche Anamnese und körperliche Untersuchung erhoben, Blut entnommen, sowie eine Endoskopie durchgeführt. Es wurden Techniken der Durchflusszytometrie, sowie der Immunfluoreszenzhistochemie verwendet.

Parallel zum Rückgang der Krankheitsaktivität wurde bei unveränderter Zahl aller T-Lymphozyten ein signifikanter Anstieg der regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut bei gleichzeitiger Abnahme in der Darmmukosa beobachtet. Zudem wurde ein signifikanter Anstieg der $\alpha 4+\beta 7^{\text{high}}\text{Foxp3}^+$ Gut-Homing Treg-Zellen im peripheren Blut gesehen. Dies wurde als Auswandern der Tregs nach Abnahme der Entzündung unter EET interpretiert, da die Zahl der apoptotischen Zellen in der Lamina propria konstant blieb. Ein signifikanter Effekt auf andere Th-Subpopulationen (CCR6⁺, IL17⁺, CRTH2⁺ oder IFN γ ⁺ T-Zellen) wurde nicht beobachtet.

Die EET induziert im betroffenen Darmabschnitt die Abheilung der Inflammation (*Deep Remission* bzw. *Mucosal Healing*). Wir postulieren, dass hierdurch die lokale Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine reduziert wird und anti-inflammatorisch wirkende Treg-Zellen in das periphere Blut auswandern, um wieder Teil des zentralen Treg-Pools zu werden.

Interessanterweise wurden ähnliche immunologische Veränderungen unter einer Anti-TNF-Antikörpertherapie bei M. Crohn beschrieben, was auf die hohe Wirksamkeit der EET hinweist. Unsere Ergebnisse weisen auf eine Schlüsselrolle regulatorischer T-Zellen hin. Gleichzeitig werden weitere Fragen aufgeworfen, etwa über die Rolle des Darm-Mikrobioms, der Migration regulatorischer T-Zellen oder der Zellplastizität in den immunologischen Abläufen im Darm von Kindern und Jugendlichen mit MC. Diese Fragen müssen im Rahmen weiterführender Forschung beantwortet werden, um diese immer häufiger im Kindesalter auftretende schwere Krankheit gleichzeitig möglichst nebenwirkungsarm und dauerhaft wirksam therapieren zu können.

6. Literaturverzeichnis

1. Benchimol EI, Fortinsky KJ, Gozdyra P, Van den Heuvel M, Van Limbergen J, Griffiths AM. Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review of international trends. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Jan;17(1):423-39. doi: 10.1002/ibd.21349. PMID: 20564651.
2. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012 Jan;142(1):46-54.e42; quiz e30. doi: 10.1053/j.gastro.2011.10.001. Epub 2011 Oct 14. PMID: 22001864.
3. Friedt, M, and Braegger, CP, Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED). In: Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung. Rodeck, B, and Zimmer, K-P eds. (2013): Springer Verlag, pp. 333-361.
4. Kelsen J, Baldassano RN. Inflammatory bowel disease: the difference between children and adults. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Oct;14 Suppl 2:S9-11. doi: 10.1002/ibd.20560. Erratum in: *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Sep;15(9):1438-47. PMID: 18816756.
5. Dignass A, Preiss JC, Aust DE, Autschbach F, Ballauff A, Barretton G, Bokemeyer B, Fichtner-Feigl S, Hagel S, Herrlinger KR, Jantschek G, Kroesen A, Kruis W, Kucharzik T, Langhorst J, Reinshagen M, Rogler G, Schleiermacher D, Schmidt C, Schreiber S, Schulze H, Stange E, Zeitz M, Hoffmann JC, Stallmach A. Aktualisierte Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa 2011 - Ergebnisse einer Evidenzbasierten Konsensuskonferenz [Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011]. *Z Gastroenterol*. 2011 Sep;49(9):1276-341. German. doi: 10.1055/s-0031-1281666. Epub 2011 Aug 24. PMID: 21866493.
6. Preiß JC, Bokemeyer B, Buhr HJ, Dignaß A, Häuser W, Hartmann F, Herrlinger KR, Kaltz B, Kienle P, Kruis W, Kucharzik T, Langhorst J, Schreiber S, Siegmund B, Stallmach A, Stange EF, Stein J, Hoffmann JC; German Society of Gastroenterology. Aktualisierte S3-Leitlinie--"Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn" 2014 [Updated German clinical practice guideline on "Diagnosis and treatment of Crohn's disease" 2014]. *Z Gastroenterol*. 2014 Dec;52(12):1431-84. German. doi: 10.1055/s-0034-1385199. Epub 2014 Dec 4. PMID: 25474283.
7. Wittig R, Albers L, Koletzko S, Saam J, von Kries R. Pediatric Chronic Inflammatory Bowel Disease in a German Statutory Health INSURANCE-Incidence Rates From 2009 to 2012. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2019 Feb;68(2):244-250. doi: 10.1097/MPG.0000000000002162. PMID: 30672768.
8. M'Koma AE. Inflammatory bowel disease: an expanding global health problem. *Clin Med Insights Gastroenterol*. 2013 Aug 14;6:33-47. doi: 10.4137/CGast.S12731. PMID: 24833941; PMCID: PMC4020403.
9. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015 Dec;12(12):720-7. doi: 10.1038/nrgastro.2015.150. Epub 2015 Sep 1. PMID: 26323879.
10. Levine A, Koletzko S, Turner D, Escher JC, Cucchiara S, de Ridder L, Kolho KL, Veres G, Russell RK, Paerregaard A, Buderus S, Greer ML, Dias JA, Veereman-Wauters G, Lionetti P, Sladek M, Martin de Carpi J, Staiano A, Ruemmele FM, Wilson DC; European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. ESPGHAN revised porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014 Jun;58(6):795-806. doi: 10.1097/MPG.0000000000000239. PMID: 24231644.
11. Schwerd T, Koletzko S, CME Zertifizierte Fortbildung: Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Monatsschr Kinderheilkd* (2017) 165, 257-270.
12. Dotson JL, Hyams JS, Markowitz J, LeLeiko NS, Mack DR, Evans JS, Pfefferkorn MD, Griffiths AM, Otlej AR, Bousvaros A, Kugathasan S, Rosh JR, Keljo D, Carvalho RS,

- Tomer G, Mamula P, Kay MH, Kerzner B, Oliva-Hemker M, Langton CR, Crandall W. Extraintestinal manifestations of pediatric inflammatory bowel disease and their relation to disease type and severity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010 Aug;51(2):140-5. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181ca4db4. PMID: 20453677.
13. Werkstetter KJ, Schatz SB, Alberer M, Filipiak-Pittroff B, Koletzko S. Influence of exclusive enteral nutrition therapy on bone density and geometry in newly diagnosed pediatric Crohn's disease patients. *Ann Nutr Metab.* 2013;63(1-2):10-6. doi: 10.1159/000350369. Epub 2013 Jul 17. PMID: 23867548.
 14. Koletzko S, Schwerd T, Ernährungstherapie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. *Monatsschr Kinderheilkd* (2004) 152, 145-152.
 15. Mamula P, Baldassano RN, *Pediatric Inflammatory Bowel Disease.* Springer (New York) (2008).
 16. Chandrakumar A, Georgy M, Agarwal P, 't Jong GW, El-Matary W. Anti-Saccharomyces cerevisiae Antibodies as a Prognostic Biomarker in Children With Crohn Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2019 Jul;69(1):82-87. doi: 10.1097/MPG.0000000000002311. PMID: 30789863.
 17. Frivolt, K, Treatment of pediatric Crohn's disease: Immunomodulation and outcome after exclusive enteral nutritional therapy and infliximab. In: Department of Pediatrics, University Children´s Hospital Bratislava Bratislava: Comenius University in Bratislava, Faculty of medicine (2017).
 18. Vasiliauskas EA, Kam LY, Karp LC, Gaiennie J, Yang H, Targan SR. Marker antibody expression stratifies Crohn's disease into immunologically homogeneous subgroups with distinct clinical characteristics. *Gut.* 2000 Oct;47(4):487-96. doi: 10.1136/gut.47.4.487. PMID: 10986208; PMCID: PMC1728065.
 19. Henderson P, Anderson NH, Wilson DC. The diagnostic accuracy of fecal calprotectin during the investigation of suspected pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2014 May;109(5):637-45. doi: 10.1038/ajg.2013.131. Epub 2013 May 14. PMID: 23670113.
 20. Buderus S, Scholz D, Behrens R, Classen M, De Laffolie J, Keller KM, Zimmer KP, Koletzko S; CEDATA-GPGE Study Group. Inflammatory bowel disease in pediatric patients: Characteristics of newly diagnosed patients from the CEDATA-GPGE Registry. *Dtsch Arztebl Int.* 2015 Feb 20;112(8):121-7. doi: 10.3238/arztebl.2015.0121. PMID: 25759978; PMCID: PMC4361801.
 21. Aloj, M., et al. (2015) Magnetic resonance enterography, small-intestine contrast US, and capsule endoscopy to evaluate the small bowel in pediatric Crohn's disease: a prospective, blinded, comparison study. *Gastrointest Endosc* 81(2), 420-427.
 22. de Laffolie J, Wendt C, , Hauer A, CEDATA-GPGE. Häufigkeit und Charakterisierung von negativen Prädiktoren (Predictors of Poor Outcome) bei Kindern und Jugendlichen mit Morbus Crohn – Daten des CEDATA GPGE Registers. *Zeitschrift für Gastroenterologie* (2016) 54, 8.
 23. Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK, Fell J, Remmele FM, Walters T, Sherlock M, Dubinsky M, Hyams JS. Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis.* 2011 Jun;17(6):1314-21. doi: 10.1002/ibd.21493. Epub 2010 Nov 8. PMID: 21560194.
 24. Turner D, Griffiths AM, Walters TD, Seah T, Markowitz J, Pfefferkorn M, Keljo D, Waxman J, Otley A, LeLeiko NS, Mack D, Hyams J, Levine A. Mathematical weighting of the pediatric Crohn's disease activity index (PCDAI) and comparison with its other short versions. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 Jan;18(1):55-62. doi: 10.1002/ibd.21649. Epub 2011 Feb 23. PMID: 21351206.
 25. Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, Gryboski JD, Kibort PM, Kirschner BS, Griffiths AM, Katz AJ, Grand RJ, Boyle JT, et al. Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1991 May;12(4):439-47. PMID: 1678008.

-
26. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2009 Nov 19;361(21):2066-78. doi: 10.1056/NEJMra0804647. PMID: 19923578; PMCID: PMC3491806.
 27. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, de Silva A, Cook JT, Barnardo M, Cullen S, Welsh KI, Jewell DP. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002 Apr;122(4):854-66. doi: 10.1053/gast.2002.32413. Erratum in: *Gastroenterology*. 2003 Jul;125(1):281. PMID: 11910336.
 28. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol*. 2004 Dec;99(12):2393-404. doi: 10.1111/j.1572-0241.2004.40304.x. PMID: 15571588.
 29. Abraham C, Cho JH. Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations. *Inflamm Bowel Dis*. 2006 Jul;12(7):641-50. doi: 10.1097/01.MIB.0000225332.83861.5f. PMID: 16804402.
 30. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhardt AH, Targan SR, Xavier RJ; NIDDK IBD Genetics Consortium, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E; Belgian-French IBD Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghorri J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M, Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008 Aug;40(8):955-62. doi: 10.1038/ng.175. Epub 2008 Jun 29. PMID: 18587394; PMCID: PMC2574810.
 31. Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*. 2009 Aug;58(8):1152-67. doi: 10.1136/gut.2008.163667. PMID: 19592695.
 32. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nuñez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*. 2003 Feb 21;278(8):5509-12. doi: 10.1074/jbc.C200673200. Epub 2003 Jan 4. PMID: 12514169.
 33. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. 2003 Mar 14;278(11):8869-72. doi: 10.1074/jbc.C200651200. Epub 2003 Jan 13. PMID: 12527755.
 34. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*. 2005 Feb 4;307(5710):731-4. doi: 10.1126/science.1104911. PMID: 15692051.
 35. Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ, Franke B, Sprong T, Naber TH, Drenth JP, Van der Meer JW. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur J Immunol*. 2004 Jul;34(7):2052-9. doi: 10.1002/eji.200425229. PMID: 15214053.
 36. McGeachy MJ, Cua DJ. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):445-53. doi: 10.1016/j.immuni.2008.03.001. PMID: 18400187.
 37. Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Cárcamo CV, Ahern PP, Iwakura Y, Maloy KJ, Powrie F. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):559-70. doi: 10.1016/j.immuni.2008.02.019. PMID: 18400195; PMCID: PMC2292821.

38. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häsler R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet.* 2007 Feb;39(2):207-11. doi: 10.1038/ng1954. Epub 2006 Dec 31. PMID: 17200669.
39. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, Roberts RG, Nimmo ER, Cummings FR, Soars D, Drummond H, Lees CW, Khawaja SA, Bagnall R, Burke DA, Todhunter CE, Ahmad T, Onnie CM, McArdle W, Strachan D, Bethel G, Bryan C, Lewis CM, Deloukas P, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Satsangi J, Mansfield JC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon L, Mathew CG. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet.* 2007 Jul;39(7):830-2. doi: 10.1038/ng2061. Epub 2007 Jun 6. PMID: 17554261; PMCID: PMC2628541.
40. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P, Barmada MM, Datta LW, Shugart YY, Griffiths AM, Targan SR, Ippoliti AF, Bernard EJ, Mei L, Nicolae DL, Regueiro M, Schumm LP, Steinhardt AH, Rotter JI, Duerr RH, Cho JH, Daly MJ, Brant SR. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet.* 2007 May;39(5):596-604. doi: 10.1038/ng2032. Epub 2007 Apr 15. PMID: 17435756; PMCID: PMC2757939.
41. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, Chilewski SD, Landry A, Goyette P, Zody MC, Hall JL, Brant SR, Cho JH, Duerr RH, Silverberg MS, Taylor KD, Rioux JD, Altshuler D, Daly MJ, Xavier RJ. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008 Sep;40(9):1107-12. doi: 10.1038/ng.215. PMID: 19165925; PMCID: PMC2731799.
42. Glas J, Konrad A, Schmechel S, Dambacher J, Seiderer J, Schroff F, Wetzke M, Roeske D, Török HP, Tonenchi L, Pfennig S, Haller D, Griga T, Klein W, Epplen JT, Folwaczny C, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Mussack T, Folwaczny M, Müller-Myhsok B, Brand S. The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am J Gastroenterol.* 2008 Mar;103(3):682-91. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01694.x. Epub 2007 Dec 20. PMID: 18162085.
43. Kuballa P, Huett A, Rioux JD, Daly MJ, Xavier RJ. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One.* 2008;3(10):e3391. doi: 10.1371/journal.pone.0003391. Epub 2008 Oct 13. PMID: 18852889; PMCID: PMC2566595.
44. Barreiro-de Acosta M, Alvarez Castro A, Souto R, Iglesias M, Lorenzo A, Dominguez-Muñoz JE. Emigration to western industrialized countries: A risk factor for developing inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis.* 2011 Dec;5(6):566-9. doi: 10.1016/j.crohns.2011.05.009. Epub 2011 Jun 22. PMID: 22115376.
45. Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet.* 1994 Mar 26;343(8900):766-7. doi: 10.1016/s0140-6736(94)91841-4. PMID: 7907734.
46. Amre DK, Lambrette P, Law L, Krupoves A, Chotard V, Costea F, Grimard G, Israel D, Mack D, Seidman EG. Investigating the hygiene hypothesis as a risk factor in pediatric onset Crohn's disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol.* 2006 May;101(5):1005-11. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00526.x. PMID: 16573775.
47. Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cézard JP. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet.* 2003 Dec 13;362(9400):2012-5. doi: 10.1016/S0140-6736(03)15024-6. PMID: 14683664.
48. Bernstein CN, Rawsthorne P, Cheang M, Blanchard JF. A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am J Gastroenterol.* 2006 May;101(5):993-1002. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00381.x. PMID: 16696783.

49. Hlavaty T, Toth J, Koller T, Krajcovicova A, Oravcova S, Zelinkova Z, Huorka M. Smoking, breastfeeding, physical inactivity, contact with animals, and size of the family influence the risk of inflammatory bowel disease: A Slovak case-control study. *United European Gastroenterol J*. 2013 Apr;1(2):109-19. doi: 10.1177/2050640613478011. PMID: 24917948; PMCID: PMC4040732.
50. Lashner BA, Loftus EV Jr. True or false? The hygiene hypothesis for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2006 May;101(5):1003-4. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00563.x. PMID: 16696784.
51. Radon K, Windstetter D, Poluda AL, Mueller B, von Mutius E, Koletzko S; Chronische Autoimmunerkrankungen und Kontakt zu Tieren (Chronic Autoimmune Disease and Animal Contact) Study Group. Contact with farm animals in early life and juvenile inflammatory bowel disease: a case-control study. *Pediatrics*. 2007 Aug;120(2):354-61. doi: 10.1542/peds.2006-3624. PMID: 17671062.
52. Nerich V, Jantchou P, Boutron-Ruault MC, Monnet E, Weill A, Vanbockstael V, Auleley GR, Balaire C, Dubost P, Rican S, Allemand H, Carbonnel F. Low exposure to sunlight is a risk factor for Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011 Apr;33(8):940-5. doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04601.x. Epub 2011 Feb 20. PMID: 21332762.
53. Wang TT, Dabbas B, Laperriere D, Bitton AJ, Soualhine H, Tavera-Mendoza LE, Dionne S, Servant MJ, Bitton A, Seidman EG, Mader S, Behr MA, White JH. Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *J Biol Chem*. 2010 Jan 22;285(4):2227-31. doi: 10.1074/jbc.C109.071225. Epub 2009 Nov 30. PMID: 19948723; PMCID: PMC2807280.
54. Müller KE, Lakatos PL, Papp M, Veres G. Incidence and paris classification of pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Res Pract*. 2014;2014:904307. doi: 10.1155/2014/904307. Epub 2014 Mar 20. Erratum in: *Gastroenterol Res Pract*. 2015;2015:804318. PMID: 24778643; PMCID: PMC3979067.
55. Malmborg P, Grahnquist L, Lindholm J, Montgomery S, Hildebrand H. Increasing incidence of paediatric inflammatory bowel disease in northern Stockholm County, 2002-2007. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013 Jul;57(1):29-34. doi: 10.1097/MPG.0b013e31828f21b4. PMID: 23459320.
56. Martín-de-Carpi J, Rodríguez A, Ramos E, Jiménez S, Martínez-Gómez MJ, Medina E; SPIRIT-IBD Working Group of Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica. Increasing incidence of pediatric inflammatory bowel disease in Spain (1996-2009): the SPIRIT Registry. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Jan;19(1):73-80. doi: 10.1002/ibd.22980. PMID: 22535573.
57. Mueller C, Macpherson AJ. Layers of mutualism with commensal bacteria protect us from intestinal inflammation. *Gut*. 2006 Feb;55(2):276-84. doi: 10.1136/gut.2004.054098. PMID: 16407387; PMCID: PMC1856516.
58. Eksteen B, Liaskou E, Adams DH. Lymphocyte homing and its role in the pathogenesis of IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Sep;14(9):1298-312. doi: 10.1002/ibd.20453. PMID: 18393377.
59. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005 Mar 25;307(5717):1915-20. doi: 10.1126/science.1104816. PMID: 15790844.
60. Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantscheff P, Allez M, Peeters H, Bommelaer G, Desreumaux P, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest*. 2007 Jun;117(6):1566-74. doi: 10.1172/JCI30504. Epub 2007 May 24. PMID: 17525800; PMCID: PMC1868786.
61. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol*. 2000 Aug;1(2):113-8. doi: 10.1038/77783. PMID: 11248802.

62. Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science*. 2000 Jun 23;288(5474):2222-6. doi: 10.1126/science.288.5474.2222. PMID: 10864873.
63. Taupin D, Podolsky DK. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Sep;4(9):721-32. doi: 10.1038/nrm1203. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Oct;4(10):819. PMID: 14506475.
64. McVay LD, Keilbaugh SA, Wong TM, Kierstein S, Shin ME, Lehrke M, Lefterova MI, Shifflett DE, Barnes SL, Cominelli F, Cohn SM, Hecht G, Lazar MA, Haczku A, Wu GD. Absence of bacterially induced RELM β reduces injury in the dextran sodium sulfate model of colitis. *J Clin Invest*. 2006 Nov;116(11):2914-23. doi: 10.1172/JCI28121. Epub 2006 Oct 5. PMID: 17024245; PMCID: PMC1590268.
65. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H Jr, Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 13;102(50):18129-34. doi: 10.1073/pnas.0505256102. Epub 2005 Dec 5. PMID: 16330776; PMCID: PMC1306791.
66. Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, Radford-Smith GL. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*. 2008 Jul;57(7):903-10. doi: 10.1136/gut.2007.142588. Epub 2008 Feb 27. PMID: 18305068.
67. Madara JL. Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:143-59. doi: 10.1146/annurev.physiol.60.1.143. PMID: 9558458.
68. Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol*. 2006 Dec;169(6):1901-9. doi: 10.2353/ajpath.2006.060681. PMID: 17148655; PMCID: PMC1762492.
69. Hershberg RM, Cho DH, Youakim A, Bradley MB, Lee JS, Framson PE, Nepom GT. Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J Clin Invest*. 1998 Aug 15;102(4):792-803. doi: 10.1172/JCI3201. PMID: 9710448; PMCID: PMC508942.
70. Sanderson IR, Ouellette AJ, Carter EA, Walker WA, Harmatz PR. Differential regulation of B7 mRNA in enterocytes and lymphoid cells. *Immunology*. 1993 Jul;79(3):434-8. PMID: 7691725; PMCID: PMC1421973.
71. Owen RL, Jones AL. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology*. 1974 Feb;66(2):189-203. PMID: 4810912.
72. Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol*. 2001 Nov;2(11):1004-9. doi: 10.1038/ni1101-1004. PMID: 11685223.
73. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):987-95. doi: 10.1038/ni1112. PMID: 15454922.
74. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52. doi: 10.1038/32588. PMID: 9521319.
75. Campbell DJ, Butcher EC. Intestinal attraction: CCL25 functions in effector lymphocyte recruitment to the small intestine. *J Clin Invest*. 2002 Oct;110(8):1079-81. doi: 10.1172/JCI16946. PMID: 12393843; PMCID: PMC150808.
76. Garside P, Millington O, Smith KM. The anatomy of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Dec;1029:9-15. doi: 10.1196/annals.1309.002. PMID: 15681738.
77. Kunkel EJ, Campbell DJ, Butcher EC. Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity. *Microcirculation*. 2003 Jun;10(3-4):313-23. doi: 10.1038/sj.mn.7800196. PMID: 12851648.
78. Read S, Malmström V, Powrie F. 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*. 2000 Jul 17;192(2):295-302. doi: 10.1084/jem.192.2.295. PMID: 10899916; PMCID: PMC2193261.
79. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997 Oct 16;389(6652):737-42. doi: 10.1038/39614. PMID: 9338786.
 80. Weiner HL. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. *Nat Immunol*. 2001 Aug;2(8):671-2. doi: 10.1038/90604. PMID: 11477400.
 81. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:713-58. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.140942. Epub 2001 Dec 19. PMID: 12500979.
 82. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996 Oct 31;383(6603):787-93. doi: 10.1038/383787a0. PMID: 8893001.
 83. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*. 2002 Dec;2(12):933-44. doi: 10.1038/nri954. PMID: 12461566.
 84. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73. doi: 10.1146/annurev.iy.07.040189.001045. PMID: 2523712.
 85. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol*. 1997 Mar;150(3):823-32. PMID: 9060820; PMCID: PMC1857889.
 86. Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Lizza F, Pallone F. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology*. 1997 Apr;112(4):1169-78. doi: 10.1016/s0016-5085(97)70128-8. PMID: 9098000.
 87. Liu Z, Colpaert S, D'Haens GR, Kasran A, de Boer M, Rutgeerts P, Geboes K, Ceuppens JL. Hyperexpression of CD40 ligand (CD154) in inflammatory bowel disease and its contribution to pathogenic cytokine production. *J Immunol*. 1999 Oct 1;163(7):4049-57. PMID: 10491009.
 88. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol*. 1996 Aug 1;157(3):1261-70. PMID: 8757634.
 89. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003 Jan;52(1):65-70. doi: 10.1136/gut.52.1.65. PMID: 12477762; PMCID: PMC1773503.
 90. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, Isobe K, Hibi T. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 2008 Dec;57(12):1682-9. doi: 10.1136/gut.2007.135053. Epub 2008 Jul 24. PMID: 18653729.
 91. Kugathasan S, Saubermann LJ, Smith L, Kou D, Itoh J, Binion DG, Levine AD, Blumberg RS, Fiocchi C. Mucosal T-cell immunoregulation varies in early and late inflammatory bowel disease. *Gut*. 2007 Dec;56(12):1696-705. doi: 10.1136/gut.2006.116467. Epub 2007 Aug 6. PMID: 17682002; PMCID: PMC2095703.
 92. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1123-32. doi: 10.1038/ni1254. Epub 2005 Oct 2. PMID: 16200070.
 93. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1133-41. doi: 10.1038/ni1261. Epub 2005 Oct 2. PMID: 16200068; PMCID: PMC1618871.

94. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-8. doi: 10.1038/nature04753. Epub 2006 Apr 30. PMID: 16648838.
95. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006 Feb;24(2):179-89. doi: 10.1016/j.immuni.2006.01.001. PMID: 16473830.
96. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*. 2007 Sep;8(9):950-7. doi: 10.1038/ni1497. Epub 2007 Aug 5. PMID: 17676044.
97. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*. 2007 Sep;8(9):942-9. doi: 10.1038/ni1496. Epub 2007 Aug 5. PMID: 17676045.
98. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol*. 2008 Jun;9(6):641-9. doi: 10.1038/ni.1610. Epub 2008 May 4. PMID: 18454151; PMCID: PMC2597394.
99. Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, Soumelis V. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol*. 2008 Jun;9(6):650-7. doi: 10.1038/ni.1613. Epub 2008 May 4. PMID: 18454150.
100. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*. 2008 Jul 17;454(7202):350-2. doi: 10.1038/nature07021. Epub 2008 May 11. PMID: 18469800; PMCID: PMC2760130.
101. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003 Feb 13;421(6924):744-8. doi: 10.1038/nature01355. PMID: 12610626.
102. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1951-7. doi: 10.1084/jem.20030896. Epub 2003 Dec 8. PMID: 14662908; PMCID: PMC2194162.
103. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1310-6. doi: 10.1172/JCI21404. PMID: 16670770; PMCID: PMC1451201.
104. Elson CO, Cong Y, Weaver CT, Schoeb TR, McClanahan TK, Fick RB, Kastelein RA. Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology*. 2007 Jun;132(7):2359-70. doi: 10.1053/j.gastro.2007.03.104. Epub 2007 Apr 13. PMID: 17570211.
105. Neurath MF. IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat Med*. 2007 Jan;13(1):26-8. doi: 10.1038/nm0107-26. PMID: 17206128.
106. Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity*. 2009 May;30(5):616-25. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.009. PMID: 19464984; PMCID: PMC4410181.

107. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008 May 30;133(5):775-87. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.009. PMID: 18510923.
108. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61. doi: 10.1126/science.1079490. Epub 2003 Jan 9. PMID: 12522256.
109. Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, Cheroutre H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*. 2007 Jul 13;317(5835):256-60. doi: 10.1126/science.1145697. Epub 2007 Jun 14. PMID: 17569825.
110. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med*. 2007 Aug 6;204(8):1775-85. doi: 10.1084/jem.20070602. Epub 2007 Jul 9. PMID: 17620362; PMCID: PMC2118682.
111. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*. 2007 Aug 6;204(8):1757-64. doi: 10.1084/jem.20070590. Epub 2007 Jul 9. PMID: 17620361; PMCID: PMC2118683.
112. Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med*. 2007 Aug 6;204(8):1765-74. doi: 10.1084/jem.20070719. Epub 2007 Jul 9. PMID: 17620363; PMCID: PMC2118687.
113. Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, Cummins A, Barry S. Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol*. 2010 Jan;30(1):80-9. doi: 10.1007/s10875-009-9345-1. PMID: 19936899.
114. Niederau C, Backmerhoff F, Schumacher B, Niederau C. Inflammatory mediators and acute phase proteins in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology*. 1997 Jan-Feb;44(13):90-107. PMID: 9058126.
115. Boschetti G, Nancey S, Sardi F, Roblin X, Flourié B, Kaiserlian D. Therapy with anti-TNF α antibody enhances number and function of Foxp3(+) regulatory T cells in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Jan;17(1):160-70. doi: 10.1002/ibd.21308. PMID: 20848510.
116. Li Z, Arijis I, De Hertogh G, Vermeire S, Noman M, Bullens D, Coorevits L, Sagaert X, Schuit F, Rutgeerts P, Ceuppens JL, Van Assche G. Reciprocal changes of Foxp3 expression in blood and intestinal mucosa in IBD patients responding to infliximab. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Aug;16(8):1299-310. doi: 10.1002/ibd.21229. PMID: 20196149.
117. Reikvam DH, Perminow G, Lyckander LG, Gran JM, Brandtzaeg P, Vatn M, Carlsen HS. Increase of regulatory T cells in ileal mucosa of untreated pediatric Crohn's disease patients. *Scand J Gastroenterol*. 2011 May;46(5):550-60. doi: 10.3109/00365521.2011.551887. Epub 2011 Feb 1. PMID: 21281255.
118. Veltkamp C, Anstaett M, Wahl K, Möller S, Gangl S, Bachmann O, Hardtke-Wolenski M, Länger F, Stremmel W, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H. Apoptosis of regulatory T lymphocytes is increased in chronic inflammatory bowel disease and reversed by anti-TNF α treatment. *Gut*. 2011 Oct;60(10):1345-53. doi: 10.1136/gut.2010.217117. Epub 2011 Apr 1. PMID: 21459928.
119. Kunkel EJ, Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Boisvert J, Roberts AI, Ebert EC, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Greenberg HB, Parker CM, Butcher EC, Andrew DP, Agace WW. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med*. 2000 Sep 4;192(5):761-8. doi: 10.1084/jem.192.5.761. PMID: 10974041; PMCID: PMC2193265.

120. Eksteen B, Grant AJ, Miles A, Curbishley SM, Lalor PF, Hübscher SG, Briskin M, Salmon M, Adams DH. Hepatic endothelial CCL25 mediates the recruitment of CCR9+ gut-homing lymphocytes to the liver in primary sclerosing cholangitis. *J Exp Med*. 2004 Dec 6;200(11):1511-7. doi: 10.1084/jem.20041035. Epub 2004 Nov 22. PMID: 15557349; PMCID: PMC2211943.
121. Miles A, Liaskou E, Eksteen B, Lalor PF, Adams DH. CCL25 and CCL28 promote alpha4 beta7-integrin-dependent adhesion of lymphocytes to MAdCAM-1 under shear flow. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008 May;294(5):G1257-67. doi: 10.1152/ajpgi.00266.2007. Epub 2008 Feb 28. PMID: 18308860.
122. Wang C, Kang SG, Lee J, Sun Z, Kim CH. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol*. 2009 Mar;2(2):173-83. doi: 10.1038/mi.2008.84. Epub 2009 Jan 7. PMID: 19129757; PMCID: PMC2709747.
123. Wohlfert EA, Grainger JR, Bouladoux N, Konkel JE, Oldenhove G, Ribeiro CH, Hall JA, Yagi R, Naik S, Bhairavabhotla R, Paul WE, Bosselut R, Wei G, Zhao K, Oukka M, Zhu J, Belkaid Y. GATA3 controls Foxp3⁺ regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J Clin Invest*. 2011 Nov;121(11):4503-15. doi: 10.1172/JCI57456. Epub 2011 Oct 3. PMID: 21965331; PMCID: PMC3204837.
124. Voo KS, Wang YH, Santori FR, Boggiano C, Wang YH, Arima K, Bover L, Hanabuchi S, Khalili J, Marinova E, Zheng B, Littman DR, Liu YJ. Identification of IL-17-producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 24;106(12):4793-8. doi: 10.1073/pnas.0900408106. Epub 2009 Mar 9. PMID: 19273860; PMCID: PMC2653560.
125. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, Rudensky AY. CD4⁺ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science*. 2009 Nov 13;326(5955):986-91. doi: 10.1126/science.1172702. Epub 2009 Oct 1. PMID: 19797626; PMCID: PMC4408196.
126. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, Ramos HL, Wei L, Davidson TS, Bouladoux N, Grainger JR, Chen Q, Kanno Y, Watford WT, Sun HW, Eberl G, Shevach EM, Belkaid Y, Cua DJ, Chen W, O'Shea JJ. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature*. 2010 Oct 21;467(7318):967-71. doi: 10.1038/nature09447. PMID: 20962846; PMCID: PMC3108066.
127. Yeh WI, McWilliams IL, Harrington LE. Autoreactive Tbet-positive CD4 T cells develop independent of classic Th1 cytokine signaling during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2011 Nov 15;187(10):4998-5006. doi: 10.4049/jimmunol.1100031. Epub 2011 Oct 7. PMID: 21984703; PMCID: PMC3709433.
128. Niess JH, Leithäuser F, Adler G, Reimann J. Commensal gut flora drives the expansion of proinflammatory CD4 T cells in the colonic lamina propria under normal and inflammatory conditions. *J Immunol*. 2008 Jan 1;180(1):559-68. doi: 10.4049/jimmunol.180.1.559. PMID: 18097058.
129. Ivanov II, Frutos Rde L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, Finlay BB, Littman DR. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe*. 2008 Oct 16;4(4):337-49. doi: 10.1016/j.chom.2008.09.009. PMID: 18854238; PMCID: PMC2597589.
130. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science*. 2011 Jan 21;331(6015):337-41. doi: 10.1126/science.1198469. Epub 2010 Dec 23. PMID: 21205640; PMCID: PMC3969237.
131. Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008 Jul 21;14(27):4280-8. doi: 10.3748/wjg.14.4280. PMID: 18666314; PMCID: PMC2731177.
132. Ruemmele FM, Veres G, Kolho KL, Griffiths A, Levine A, Escher JC, Amil Dias J, Barabino A, Braegger CP, Bronsky J, Buderus S, Martín-de-Carpi J, De Ridder L,

- Fagerberg UL, Hugot JP, Kierkus J, Kolacek S, Koletzko S, Lionetti P, Miele E, Navas López VM, Paerregaard A, Russell RK, Serban DE, Shaoul R, Van Rheenen P, Veereman G, Weiss B, Wilson D, Dignass A, Eliakim A, Winter H, Turner D; European Crohn's and Colitis Organisation; European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Consensus guidelines of ECCO/ESPGHAN on the medical management of pediatric Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2014 Oct;8(10):1179-207. doi: 10.1016/j.crohns.2014.04.005. Epub 2014 Jun 6. PMID: 24909831.
133. Turner D, Levine A, Escher JC, Griffiths AM, Russell RK, Dignass A, Dias JA, Bronsky J, Braegger CP, Cucchiara S, de Ridder L, Fagerberg UL, Hussey S, Hugot JP, Kolacek S, Kolho KL, Lionetti P, Paerregaard A, Potapov A, Rintala R, Serban DE, Staiano A, Sweeny B, Veerman G, Veres G, Wilson DC, Ruemmele FM; European Crohn's and Colitis Organization; European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Management of pediatric ulcerative colitis: joint ECCO and ESPGHAN evidence-based consensus guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012 Sep;55(3):340-61. doi: 10.1097/MPG.0b013e3182662233. PMID: 22773060.
134. Danese S, Vuitton L, Peyrin-Biroulet L. Biologic agents for IBD: practical insights. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015 Sep;12(9):537-45. doi: 10.1038/nrgastro.2015.135. Epub 2015 Aug 18. PMID: 26284562.
135. Singh N, Rabizadeh S, Jossen J, Pittman N, Check M, Hashemi G, Phan BL, Hyams JS, Dubinsky MC. Multi-Center Experience of Vedolizumab Effectiveness in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2016 Sep;22(9):2121-6. doi: 10.1097/MIB.0000000000000865. PMID: 27542130.
136. Derkx B, Taminiau J, Radema S, Stronkhorst A, Wortel C, Tytgat G, van Deventer S. Tumour-necrosis-factor antibody treatment in Crohn's disease. *Lancet*. 1993 Jul 17;342(8864):173-4. doi: 10.1016/0140-6736(93)91375-v. PMID: 8101267.
137. Hyams JS, Markowitz J, Wyllie R. Use of infliximab in the treatment of Crohn's disease in children and adolescents. *J Pediatr*. 2000 Aug;137(2):192-6. doi: 10.1067/mpd.2000.107161. PMID: 10931411.
138. Kugathasan S, Werlin SL, Martinez A, Rivera MT, Heikenen JB, Binion DG. Prolonged duration of response to infliximab in early but not late pediatric Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2000 Nov;95(11):3189-94. doi: 10.1111/j.1572-0241.2000.03263.x. PMID: 11095340.
139. Baldassano R, Braegger CP, Escher JC, DeWoody K, Hendricks DF, Keenan GF, Winter HS. Infliximab (REMICADE) therapy in the treatment of pediatric Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2003 Apr;98(4):833-8. doi: 10.1111/j.1572-0241.2003.07343.x. PMID: 12738464.
140. Ruemmele FM, Lachaux A, Cézard JP, Morali A, Maurage C, Giniès JL, Viola S, Goulet O, Lamireau T, Scaillon M, Breton A, Sarles J; Groupe Francophone d'Hépatologie, Gastroentérologie et Nutrition Pédiatrique. Efficacy of infliximab in pediatric Crohn's disease: a randomized multicenter open-label trial comparing scheduled to on demand maintenance therapy. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Mar;15(3):388-94. doi: 10.1002/ibd.20788. PMID: 19023899.
141. Hyams J, Crandall W, Kugathasan S, Griffiths A, Olson A, Johanns J, Liu G, Travers S, Heuschkel R, Markowitz J, Cohen S, Winter H, Veereman-Wauters G, Ferry G, Baldassano R; REACH Study Group. Induction and maintenance infliximab therapy for the treatment of moderate-to-severe Crohn's disease in children. *Gastroenterology*. 2007 Mar;132(3):863-73; quiz 1165-6. doi: 10.1053/j.gastro.2006.12.003. Epub 2006 Dec 3. PMID: 17324398.
142. Kierkus J, Dadalski M, Szymanska E, Oracz G, Wegner A, Gorczewska M, Szymanska S, Woynarowski M, Ryzko J. The impact of infliximab induction therapy on mucosal healing and clinical remission in Polish pediatric patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2012 May;24(5):495-500. doi: 10.1097/MEG.0b013e32835159f2. PMID: 22387887.

143. De Bie CI, Hummel TZ, Kindermann A, Kokke FT, Damen GM, Kneepkens CM, Van Rheenen PF, Schweizer JJ, Hoekstra JH, Norbruis OF, Tjon A Ten WE, Vreugdenhil AC, Deckers-Kocken JM, Gijsbers CF, Escher JC, De Ridder L. The duration of effect of infliximab maintenance treatment in paediatric Crohn's disease is limited. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011 Jan;33(2):243-50. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04507.x. Epub 2010 Nov 14. PMID: 21083595.
144. de Ridder L, Turner D, Wilson DC, Koletzko S, Martin-de-Carpi J, Fagerberg UL, Spray C, Sladek M, Shaoul R, Roma-Giannikou E, Bronsky J, Serban DE, Cucchiara S, Veres G, Ruemmele FM, Hojsak I, Kolho KL, Davies IH, Aloï M, Lionetti P, Veereman-Wauters G, Braegger CP, Trindade E, Wewer AV, Hauer A, Levine A; Porto IBD Working Group of ESPGHAN. Malignancy and mortality in pediatric patients with inflammatory bowel disease: a multinational study from the porto pediatric IBD group. *Inflamm Bowel Dis.* 2014 Feb;20(2):291-300. doi: 10.1097/01.MIB.0000439066.69340.3c. PMID: 24374875.
145. Diak P, Siegel J, La Grenade L, Choi L, Lemery S, McMahon A. Tumor necrosis factor alpha blockers and malignancy in children: forty-eight cases reported to the Food and Drug Administration. *Arthritis Rheum.* 2010 Aug;62(8):2517-24. doi: 10.1002/art.27511. PMID: 20506368.
146. Wilschanski M, Sherman P, Pencharz P, Davis L, Corey M, Griffiths A. Supplementary enteral nutrition maintains remission in paediatric Crohn's disease. *Gut.* 1996 Apr;38(4):543-8. doi: 10.1136/gut.38.4.543. PMID: 8707085; PMCID: PMC1383112.
147. Koletzko S, Niggemann B, Arato A, Dias JA, Heuschkel R, Husby S, Mearin ML, Papadopoulou A, Ruemmele FM, Staiano A, Schäppi MG, Vandenplas Y; European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children: ESPGHAN GI Committee practical guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012 Aug;55(2):221-9. doi: 10.1097/MPG.0b013e31825c9482. PMID: 22569527.
148. Dziechciarz P, Horvath A, Shamir R, Szajewska H. Meta-analysis: enteral nutrition in active Crohn's disease in children. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Sep 15;26(6):795-806. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03431.x. PMID: 17767463.
149. Borrelli O, Cordischi L, Cirulli M, Paganelli M, Labalestra V, Uccini S, Russo PM, Cucchiara S. Polymeric diet alone versus corticosteroids in the treatment of active pediatric Crohn's disease: a randomized controlled open-label trial. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006 Jun;4(6):744-53. doi: 10.1016/j.cgh.2006.03.010. Epub 2006 May 6. PMID: 16682258.
150. Voitk AJ, Echave V, Feller JH, Brown RA, Gurd FN. Experience with elemental diet in the treatment of inflammatory bowel disease. Is this primary therapy? *Arch Surg.* 1973 Aug;107(2):329-33. doi: 10.1001/archsurg.1973.01350200189039. PMID: 4198183.
151. Buchanan E, Gaunt WW, Cardigan T, Garrick V, McGrogan P, Russell RK. The use of exclusive enteral nutrition for induction of remission in children with Crohn's disease demonstrates that disease phenotype does not influence clinical remission. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009 Sep 1;30(5):501-7. doi: 10.1111/j.1365-2036.2009.04067.x. Epub 2009 Jun 15. PMID: 19549288.
152. Alhagamhmad MH, Day AS, Lemberg DA, Leach ST. An update of the role of nutritional therapy in the management of Crohn's disease. *J Gastroenterol.* 2012 Aug;47(8):872-82. doi: 10.1007/s00535-012-0617-9. Epub 2012 Jun 15. PMID: 22699323.
153. Heuschkel RB, Menache CC, Megerian JT, Baird AE. Enteral nutrition and corticosteroids in the treatment of acute Crohn's disease in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000 Jul;31(1):8-15. doi: 10.1097/00005176-200007000-00005. PMID: 10896064.
154. Pigneur B, Lepage P, Mondot S, Schmitz J, Goulet O, Doré J, Ruemmele FM. Mucosal Healing and Bacterial Composition in Response to Enteral Nutrition Vs Steroid-based Induction Therapy-A Randomised Prospective Clinical Trial in Children With Crohn's Disease. *J Crohns Colitis.* 2019 Jul 25;13(7):846-855. doi: 10.1093/ecco-jcc/jyy207. PMID: 30541015.

155. Day AS, Whitten KE, Lemberg DA, Clarkson C, Vitug-Sales M, Jackson R, Bohane TD. Exclusive enteral feeding as primary therapy for Crohn's disease in Australian children and adolescents: a feasible and effective approach. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006 Oct;21(10):1609-14. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04294.x. PMID: 16928225.
156. Knight C, El-Matary W, Spray C, Sandhu BK. Long-term outcome of nutritional therapy in paediatric Crohn's disease. *Clin Nutr.* 2005 Oct;24(5):775-9. doi: 10.1016/j.clnu.2005.03.005. PMID: 15904998.
157. Zachos M, Tondeur M, Griffiths AM. Enteral nutritional therapy for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Jan 24;(1):CD000542. doi: 10.1002/14651858.CD000542.pub2. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2018 Apr 01;4:CD000542. PMID: 17253452.
158. Griffiths AM, Ohlsson A, Sherman PM, Sutherland LR. Meta-analysis of enteral nutrition as a primary treatment of active Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1995 Apr;108(4):1056-67. doi: 10.1016/0016-5085(95)90203-1. PMID: 7698572.
159. Afzal NA, Davies S, Paintin M, Arnaud-Battandier F, Walker-Smith JA, Murch S, Heuschkel R, Fell J. Colonic Crohn's disease in children does not respond well to treatment with enteral nutrition if the ileum is not involved. *Dig Dis Sci.* 2005 Aug;50(8):1471-5. doi: 10.1007/s10620-005-2864-6. PMID: 16110838.
160. Rubio A, Pigneur B, Garnier-Lengliné H, Talbotec C, Schmitz J, Canioni D, Goulet O, Ruemmele FM. The efficacy of exclusive nutritional therapy in paediatric Crohn's disease, comparing fractionated oral vs. continuous enteral feeding. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011 Jun;33(12):1332-9. doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04662.x. Epub 2011 Apr 20. PMID: 21507029.
161. Tjellström B, Högberg L, Stenhammar L, Magnusson KE, Midtvedt T, Norin E, Sundqvist T. Effect of exclusive enteral nutrition on gut microflora function in children with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* 2012 Dec;47(12):1454-9. doi: 10.3109/00365521.2012.703234. Epub 2012 Sep 28. PMID: 23016828.
162. Levine A, Wine E. Effects of enteral nutrition on Crohn's disease: clues to the impact of diet on disease pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis.* 2013 May;19(6):1322-9. doi: 10.1097/MIB.0b013e3182802acc. PMID: 23399738.
163. Griffiths AM. Enteral feeding in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006 May;9(3):314-8. doi: 10.1097/01.mco.0000222117.76536.49. PMID: 16607134.
164. Treem WR, Ahsan N, Shoup M, Hyams JS. Fecal short-chain fatty acids in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1994 Feb;18(2):159-64. doi: 10.1097/00005176-199402000-00007. PMID: 8014762.
165. Fell JM, Paintin M, Arnaud-Battandier F, Beattie RM, Hollis A, Kitching P, Donnet-Hughes A, MacDonald TT, Walker-Smith JA. Mucosal healing and a fall in mucosal pro-inflammatory cytokine mRNA induced by a specific oral polymeric diet in paediatric Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2000 Mar;14(3):281-9. doi: 10.1046/j.1365-2036.2000.00707.x. PMID: 10735920.
166. Turner D, Levine A, Walters TD, Focht G, Otley A, López VN, Koletzko S, Baldassano R, Mack D, Hyams J, Griffiths AM. Which PCDAI Version Best Reflects Intestinal Inflammation in Pediatric Crohn Disease? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017 Feb;64(2):254-260. doi: 10.1097/MPG.0000000000001227. PMID: 27050050.
167. Rugtveit J, Nilsen EM, Bakka A, Carlsen H, Brandtzaeg P, Scott H. Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1997 May;112(5):1493-505. doi: 10.1016/s0016-5085(97)70030-1. Erratum in: *Gastroenterology* 1997 Aug;113(2):732. PMID: 9136827.
168. Kim MJ, Lee WY, Choe YH. Expression of TIM-3, Human β -defensin-2, and FOXP3 and Correlation with Disease Activity in Pediatric Crohn's Disease with Infliximab Therapy. *Gut Liver.* 2015 May 23;9(3):370-80. doi: 10.5009/gnl13408. PMID: 25071071; PMCID: PMC4413971.

169. Buderus S, Scholz D, Behrens R, Classen M, De Laffolie J, Keller KM, Zimmer KP, Koletzko S; CEDATA-GPGE Study Group. Inflammatory bowel disease in pediatric patients: Characteristics of newly diagnosed patients from the CEDATA-GPGE Registry. *Dtsch Arztebl Int.* 2015 Feb 20;112(8):121-7. doi: 10.3238/arztebl.2015.0121. PMID: 25759978; PMCID: PMC4361801.
170. de Bie CI, Paerregaard A, Kolacek S, Ruemmele FM, Koletzko S, Fell JM, Escher JC; EUROKIDS Porto IBD Working Group of ESPGHAN. Disease phenotype at diagnosis in pediatric Crohn's disease: 5-year analyses of the EUROKIDS Registry. *Inflamm Bowel Dis.* 2013 Feb;19(2):378-85. doi: 10.1002/ibd.23008. PMID: 22573581.
171. Terrin G, Canani RB, Ambrosini A: A semielemental diet (Pregomin) as primary therapy for inducing remission in children with active Crohn's disease. *Ital J Pediatr* 2000;28:401-405.
172. Seidman EG, Lohoues MJ, Turgeon J, Bouthillier L, Morin CL. Elemental diet versus prednisone as initial therapy in Crohn's disease: early and long-term results. *Gastroenterology* 1991;100:150A.
173. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol.* 2007 Apr;19(4):345-54. doi: 10.1093/intimm/dxm014. Epub 2007 Feb 27. PMID: 17329235.
174. Nakayamada S, Takahashi H, Kanno Y, O'Shea JJ. Helper T cell diversity and plasticity. *Curr Opin Immunol.* 2012 Jun;24(3):297-302. doi: 10.1016/j.coi.2012.01.014. Epub 2012 Feb 15. PMID: 22341735; PMCID: PMC3383341.
175. Zhu XM, Huang YM, Fan JF, Shi YZ. Aberrant frequency of IL-10-producing B cells and its association with the balance of Treg/Th17 in children with inflammatory bowel disease. *Pharmazie.* 2015 Oct;70(10):656-60. PMID: 26601422.
176. Chiba T, Endo M, Miura S, Hayashi Y, Asakura Y, Oyama K, Matsumoto T. Regulatory T cells in Crohn's disease following anti-TNF- α therapy. *JGH Open.* 2019 Sep 11;4(3):378-381. doi: 10.1002/jgh3.12259. PMID: 32514440; PMCID: PMC7273727.
177. Vitale A, Strisciuglio C, Vitale S, Santopaolo M, Bruzzese D, Micillo T, Scarpato E, Miele E, Staiano A, Troncone R, Matarese G, Gianfrani C. Increased frequency of regulatory T cells in pediatric inflammatory bowel disease at diagnosis: a compensative role? *Pediatr Res.* 2020 Apr;87(5):853-861. doi: 10.1038/s41390-019-0662-7. Epub 2019 Nov 12. PMID: 31715619.
178. Cho J, Kim S, Yang DH, Lee J, Park KW, Go J, Hyun CL, Jee Y, Kang KS. Mucosal Immunity Related to FOXP3+ Regulatory T Cells, Th17 Cells and Cytokines in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *J Korean Med Sci.* 2018 Dec 10;33(52):e336. doi: 10.3346/jkms.2018.33.e336. PMID: 30584414; PMCID: PMC6300656.
179. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2003 Apr 15;170(8):3939-43. doi: 10.4049/jimmunol.170.8.3939. PMID: 12682220.
180. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, Tannapfel A, Fontenot JD, Ramsdell F, Powrie F. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol.* 2006 Nov 1;177(9):5852-60. doi: 10.4049/jimmunol.177.9.5852. PMID: 17056509; PMCID: PMC6108413.
181. Ricciardelli I, Lindley KJ, Londei M, Quaratino S. Anti tumour necrosis-alpha therapy increases the number of FOXP3 regulatory T cells in children affected by Crohn's disease. *Immunology.* 2008 Oct;125(2):178-83. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02839.x. Epub 2008 Apr 16. PMID: 18422560; PMCID: PMC2561134.
182. Schwerd T, Frivolt K, Clavel T, Lagkouvardos I, Katona G, Mayr D, Uhlig HH, Haller D, Koletzko S, Bufler P. Exclusive enteral nutrition in active pediatric Crohn disease: Effects on intestinal microbiota and immune regulation. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Aug;138(2):592-6. doi: 10.1016/j.jaci.2015.12.1331. Epub 2016 Mar 15. PMID: 26987574.

183. Eckburg PB, Relman DA. The role of microbes in Crohn's disease. *Clin Infect Dis.* 2007 Jan 15;44(2):256-62. doi: 10.1086/510385. Epub 2006 Dec 12. PMID: 17173227.
184. Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev.* 2005 Aug;206:260-76. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00291.x. PMID: 16048554.
185. Boschetti G, Nancey S, Sardi F, Roblin X, Flourié B, Kaiserlian D. Therapy with anti-TNF α antibody enhances number and function of Foxp3(+) regulatory T cells in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2011 Jan;17(1):160-70. doi: 10.1002/ibd.21308. PMID: 20848510.
186. Yamada A, Arakaki R, Saito M, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2016 Feb 21;22(7):2195-205. doi: 10.3748/wjg.v22.i7.2195. PMID: 26900284; PMCID: PMC4734996.

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
6-MP	6-Mercaptopurin
APCs	Antigen präsentierende Zellen
ASCA	Serumantikörper gegen <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ATG16L1	autophagy-related, 16-like
AZA	Azathioprin
BB	großes Blutbild
BMI	Body-Mass-Index
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CCL (z.B. CCL25)	CC-chemokineligand (z.B. 25)
CCR (z.B. 9)	Chemokinereceptor
CD (z.B. CD4)	cluster of differentiation (z.B. 4)
CDAI	Crohn´s Disease Acctivity Index
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CEDATA-GPGE [®]	Registry of Children with Inflammatory Bowel Disease in Germany and Austria
CED-U	undefinierte chronisch entzündliche Darmerkrankung
CMV	Zytomegalovirus
CRP	C-reaktives Protein
CRTH2	Prostaglandin D ₂ Rezeptor 2 (auch DP ₂)
CT	Computer Tomographie
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
CU	Colitis Ulcerosa
Cy (z.B. 3 und 5)	Cyanin-Farbstoffe (z.B. 3 und 5)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

DPX	Di-N-Butyl Phthalate in Xylene
ECCO	European Crohn's and Colitis Organisation
EET	exklusive Ernährungstherapie
ESPGHAN	European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition
EUROKIDS	Prospective registry of newly diagnosed paediatric and adolescent patients with Crohn's disease, ulcerative colitis or IBD-unclassified
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell sorter)
Fc-Region	crystallisable fragment
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	forkhead box P3
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
GATA3	GATA binding protein 3
GIT	Gastrointestinaltrakt
HIV	Humanes Immunodefizienzvirus
HPF	high power field
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Horse Radish Peroxidase
i.v.	intravenös
i.v.-KM	intravenöser-Kontrastmittel-Gabe
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IFN γ	Interferon-gamma
IgA	Immunglobulin-A
IgG1	Immunglobulin-G1
IL (z.B. IL-17)	Interleukin (z.B.17)
IRGM	immunity-related GTPase M Protein
Ki-67	Antigen Ki-67 (Ki-Kiel)
LPS	Lipopolysaccharide

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

MAdCAM-1	mucosal cell adhesion molecule 1
MAP-Kinase	mitogen-activated protein Kinase
MC	Morbus Crohn
MHC II	Major Histocompatibility Complex II
MRE	Magnet-resonanz Enterographie
MTX	Methotrexat
NF- κ B	Nuclearfactor kappa-light-chain-enhancer
NOD2	Nucleotide oligomerization domain-2
ÖGD	Ösophago-Gastro-Duodenoskopie
p.o.	Per os
pANCA	Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper mit perinukleärer
PBMCs	Peripher blood mononucleic cells
PBS	Phosphate buffered Saline
PCDAI	pediatric crohn's disease activity Index
PET	partielle Ernährungstherapie
PRR	pattern recognition Rezeptor
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
RCF	relative centrifugal force
REACH Studie	A randomized, multicenter, open-label study to evaluate the safety and efficacy of anti-TNF α chimeric monoclonal antibody (infliximab, REMICADE $\text{\textcircled{C}}$) in pediatric subjects with moderate-to-severe Crohn's disease
ROR γ t	retionoid acid-related orphan receptor-gamma t
RPMI	Zellkulturmedium, benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
s.c.	subcutan
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
STAT4	signal transducer and activator of transcription 4
Tbc	Tuberkulose

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

T-bet	T box expressed in T cells
TdT	terminal desoxynucleotidyl transferase
TGF β	transforming growth factor β
Th (z.B. 17)	helfer T-Zellen (z.B. 17)
.tif, (RGB).tif	tagged image file format, (red, green, blue).tif
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TNF	Tumornekrosefaktor
TPMT	Enzym Thiopurin-Methyltransferase
Treg	regulatorische T-Zellen
TSA-System™	Tyramide Signal Amplification System
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
WHO	World Health Organization
wPCDAI	mathematisch gewichteter PCDAI
z-Score	Standarddeviation (hier: vom Mittel des BMIs)
γ -GT	Gamma-Glutamyltransferase

8. Danksagung

Unentbehrlich für diese Studie war die Bereitschaft der Patienten und ihrer Familien an der Teilnahme, weshalb ich mich bei ihnen ganz herzlich bedanke und ihnen alles Gute wünsche.

Vielen herzlichen Dank an Prof. Dr. med. Philip Bufler dafür, dass ich in seinem Labor an diesem großen Projekt mitarbeiten durfte und für all seinen stets konstruktiven Rat und seine Hilfe.

Ein ganz großes Dankeschön gilt Herrn PD Dr. med. Tobias Schwerd als Betreuer meiner Doktorarbeit dafür, dass er mich an dieser Studie hat mitarbeiten lassen und mir stets mit Rat und Tat an Seite stand bei Erstellung dieser Dissertation aber auch in anderen Bereichen meines Studiums, wofür ich ihm für immer sehr dankbar bleiben werde.

Vielen Dank an das pathologische Institut der LMU München in der Thalkirchner Straße, besonders an Dr. med. Doris Mayr für die Aufbereitung der Biopsien.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der gastroenterologischen Station des Dr. von Hauner'schen Kinderspitals für die Gewinnung der für die Studie benötigte Untersuchungsmaterialien.

In Erinnerung möchte ich mich herzlichst bei MU Dr. Klara Frivolt PhD. bedanken für all ihre Hilfe. Sie wird uns allen sehr fehlen.

Vielen Dank an Anca, Andrea, Gaby, Rachel und Simon, meinen Kollegen im Labor, die mir mit jeder Art von Hilfe bei Entstehung dieser Dissertation geholfen haben.

Vielen lieben Dank an meinen Eltern, Katalin und Gabor, die mir das Studium ermöglicht haben.

Herzlichen Dank an meine Frau, Anna, die mich bei den Arbeiten an dieser Dissertation stets motiviert hat.

Zu guter Letzt, ein herzliches Dankeschön an meine Freunde, Benni, Matze und Stefan, die mir immer zugehört haben, wenn Versuche nicht nach Plan funktioniert haben.

9. Publikationen

- Aug 2016 Schwerd T, Frivolt K, Clavel T, Lagkouvardos I, Katona G, Mayr D, Uhlig HH, Haller D, Koletzko S, Bufler P
Exclusive enteral nutrition in active pediatric Crohn disease: Effects on intestinal microbiota and immune regulation.
The journal of allergy and clinical immunology, 2016 Aug; 138(2):592-6

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 14.09.1989 Geburtsort: Kecskemet (Ungarn)

Bisherige Arbeitsplätze

- Seit dem 15.11.2017 Universitätsklinikum Bonn, Zentrum für Kinderheilkunde
- 01.02.19 - 31.07.2019 Cap Anamur Deutsche NotÄrzte e.V.
Ola During Children's Hospital, Freetown, Sierra Leone
- 15.02.16 - 30.09.2017 Klinik für Kinder- und Jugendmedizin im Klinikum Traunstein

Schul- /Ausbildung

- 2009-2015 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Auslandsaufenthalte:
Juli '15 - Okt. '15:
Kantonsspital Graubünden, Chur, die Schweiz
Nov. '14 - Jan. '15:
Cincinnati Children's Hospital, Cincinnati, OH, USA
Feb. '14 - März '14:
Kanti Children's Hospital, Kathmandu, Nepal
Feb. '13 -April '13:
Jimma University Hospital, Jimma, Äthiopien
- 2008 - 2009 Austauschjahr am Gymnasium der Benediktiner in Meschede,
NRW, Deutschland
- 2008 Abitur am Gymnasium und Internat der Benediktiner in
Pannonhalma (Ungarn)