

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II – Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke**

**Expression, Signaltransduktion und biologische Funktionen
des CCL20/CCR6-Chemokin-Ligand-Rezeptor-Systems in
intestinalen Epithelzellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Torsten Olszak
aus Kaufbeuren

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. S. Brand
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Dr. M. Folwaczny

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Sperandio
Priv. Doz. Dr. A. Faußner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Julia Seiderer

Dekan: Herr Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2007

Meinen Eltern

Meinen Freunden

Inhaltsverzeichnis

0.	ABKÜRZUNGEN UND BEGRIFFE.....	1
1.	EINLEITUNG.....	4
1.1	Kolorektales Karzinom und chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	4
1.1.1	Kolorektales Karzinom.....	4
1.1.2	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	7
1.2	Chemokine und Chemokin-Rezeptoren.....	13
1.2.1	Chemokine.....	13
1.2.2	Chemokin-Rezeptoren.....	15
1.2.3	Chemokin-induzierte Signaltransduktionswege.....	16
1.3	Das CCL20-CCR6-Chemokin-Ligand-Rezeptor-System.....	17
1.4	Die Rolle von Chemokinen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und kolorektalem Karzinom.....	19
1.4.1	Der Einfluss der Chemokine bei der Kanzerogenese.....	19
1.4.2	Chemokine in der intestinalen Entzündung.....	21
1.5	Ziel dieser Arbeit.....	24
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1	Material.....	25
2.1.1	Chemikalien und biochemische Reagenzien.....	25
2.1.2	Kits und Reaktionssysteme.....	26
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.4	Rekombinante Proteine.....	27
2.1.5	Antikörper.....	27
2.1.6	Oligonukleotide.....	28
2.1.7	Zelllinien.....	28
2.1.7.1	Säugerzelllinien.....	28
2.1.7.2	Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen.....	29
2.2	Methoden.....	30
2.2.1	Zellkultur.....	30
2.2.1.1	Kultivierung der Zelllinien.....	30
2.2.1.2	Bestimmungen der Zellzahl.....	30
2.2.1.3	Zellstimulation.....	31

2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	31
2.2.2.1	Methoden zur RNA-Analyse.....	31
2.2.2.1.1	RNA-Isolierung aus humanen Zelllinien.....	31
2.2.2.1.2	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration.....	31
2.2.2.1.3	DNase-Behandlung der RNA-Isolierungen.....	32
2.2.2.2	Methoden zur DNA-Analyse.....	32
2.2.2.2.1	Erststrang-cDNA-Synthese (RT-PCR).....	32
2.2.2.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	32
2.2.2.2.3	Quantitative PCR nach Stimulation mit LPS, TNF- α , IL-1 β und CCL20.....	33
2.2.2.2.4	Sequenzierung.....	34
2.2.2.3	Proteinchemische Methoden.....	34
2.2.2.3.1	Zellstimulation mit CCL20 zur Analyse von ERK-1/2-, SAPK/JNK-1/2-, p38- und Akt-Phosphorylierung.....	34
2.2.2.3.2	Inhibitionsexperimente mit PD98059, SP600125, SB203580 und Wortmannin.....	34
2.2.2.3.3	Gesamtproteinextraktion aus stimulierten Zellen.....	34
2.2.2.3.4	Quantifizierung von Proteinen.....	35
2.2.2.3.5	Auftrennung von Proteinen mit SDS-PAGE.....	35
2.2.2.3.6	Western-Blot-Analyse.....	36
2.2.2.3.6.1	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot).....	36
2.2.2.3.6.2	Immundetektion von immobilisierten Proteinen.....	36
2.2.2.3.6.3	„Strippen“ von Immunoblots.....	37
2.2.2.4	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	37
2.2.3	Immunhistochemischer Nachweis von humanem CCR6 und CCL20 in Gewebekulturen.....	38
2.2.4	Zellbiologische Methoden.....	38
2.2.4.1	Zellproliferationsassay.....	38
2.2.4.2	Wounding-Assay.....	39
2.2.4.3	Apoptose-Assay.....	39
2.2.5	Densitometrie.....	40
2.2.6	Statistik.....	40

3.	ERGEBNISSE	41
3.1	Expression von CCR6 und seinem Liganden CCL20 in intestinalen Epithelzellen und kolorektalen Zellen.....	41
3.2	Regulation der CCL20-mRNA-Expression in intestinalen Epithelzellen durch proinflammatorische Zytokine.....	44
3.3	Aktivierung von CCL20-mRNA in entzündlichen Kolonläsionen bei M. Crohn-Patienten und Korrelation mit den IL-8-mRNA-Expressions- spiegeln.....	46
3.4	MEK-1 abhängige Aktivierung von ERK-1/2 MAP-Kinasen durch CCR6.....	47
3.5	SAPK/JNK- und Akt-Phosphorylierung durch CCR6-Aktivierung.....	49
3.6	Stimulation der intestinalen Epithelzellproliferation durch CCL20.....	52
3.7	Einfluss der CCR6-Aktivierung auf die Zellmigration.....	52
4.	DISKUSSION	55
4.1	Die Bedeutung der CCR6-Expression im Gastrointestinaltrakt.....	55
4.2	Einfluss der CCL20/CCR6-vermittelten Signaltransduktion.....	58
4.3	Funktionen in intestinalen Epithelzellen.....	61
4.4	Funktionen in anderen Zellpopulationen.....	64
5.	KLINISCHE BEDEUTUNG UND AUSBLICK	68
	Chemokine und Chemokin-Rezeptoren als therapeutischer Angriffspunkt	
6.	ZUSAMMENFASSUNG	69
7.	LITERATURVERZEICHNIS	71
8.	ANHANG	86
	CURRICULUM VITAE.....	86
	PUBLIKATIONEN.....	88
	DANKSAGUNG.....	94

0. Abkürzungen und Begriffe

5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
AZA	Azathioprin
BCA-1	B-cell-attracting chemokine 1
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CCL	Chemokin-Ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRA	colorectal adenoma (kolorektales Adenom)
CRC	colorectal carcinoma (kolorektales Karzinom)
CTACK	cutaneous T-cell-attracting chemokine
DC	dendritic cell (dendritische Zelle)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escheria coli
EDTA	Ethyldiamin-Tetraacetat
EGTA	Ethylene glycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid
ELC	Epstein–Barr-virus-induced gene 1 ligand chemokine
ELISA	enzyme-linked-immunosorbent-assay
ENA78	epithelial-cell-derived neutrophil-activating peptide 78
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FACS	fluorescence activated cell sorting
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
g	gravitation (Einheit für Gravitation)
GADPH	Glyzeraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GCP-2	Granulocyte chemotactic protein 2
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
Gro	Growth-regulated oncogene
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2- ethanosulfonsäure)
HCl	Salzsäure
HNPCC	hereditäres nicht-polypösen kolorektales Karzinom

IEC	intestinal epithelial cell (intestinale Epithelzelle)
IFX	Infliximab
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-inducible protein 10
I-TAC	Interferon-inducible T-cell chemoattractant
IU	internationale Einheiten
kD	Kilodalton
KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LARC	Leber- und aktivierungsreguliertes Chemokin
LiCl	Lithiumchlorid
LM	Lebermetastasen
LNM	Lymphknotenmetastasen
LPS	Lipopolysaccharid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
M	Molar
mAb	monoklonaler Antikörper
MAP Kinase	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MCP	Monocyte chemoattractant protein
M. Crohn	Morbus Crohn
MDC	Macrophage-derived chemokine
MEC	Mucosa-associated epithelial chemokine
MEK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIG	Monokine induced by interferon
min	Minute
MIP	Macrophage inflammatory protein
mm	Millimeter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium
MTX	Methotrexat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NAP-2	Neutrophil-activating peptide 2
NaVO ₃	Natriummetavanadat
NF-κB	nuclear factor-κB
nm	Nanometer
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pondus Hydrogenii
PI	Phosphatidylinositol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid

PS	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RANTES	regulated on activation, normally T-cell expressed and secreted
Ref.	Reference
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SAPK/JNK	Stress-aktivierte Protein-Kinase/c-Jun-N-terminale-Kinase
SDF	stromal-cell-derived factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLC	secondary lymphoid-tissue chemokine
TARC	Thymus- and activation-regulated chemokine
TBS-T	Tris-buffered saline Tween-20
TECK	Thymus-expressed chemokine
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
Ver.	Version
vs	versus
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Kolorektales Karzinom und chronisch entzündliche Darmerkrankungen

1.1.1 Kolorektales Karzinom

Das kolorektale Karzinom (CRC) stellt in Deutschland bei Männern nach dem Bronchialkarzinom und bei Frauen nach dem Mamma- und Uteruskarzinom den dritthäufigsten malignen Tumor dar ¹¹⁸. Es ist sowohl bei Männern als auch bei Frauen die zweithäufigste krebisbedingte Todesursache. Die Inzidenz variiert in Europa von <20 (Griechenland) bis >40/100.000/Jahr und liegt in Deutschland am höchsten ⁵⁶. In Deutschland erkranken jährlich etwa 30.000 Menschen neu am kolorektalen Karzinom. Das Risiko an CRC zu erkranken, nimmt mit steigendem Alter zu. 90% der CRC treten nach dem 50. Lebensjahr auf, allerdings finden sich gelegentlich auch Fälle vor dem 40. Lebensjahr. Die Inzidenz bei den über 40-jährigen verdoppelt sich alle 10 Jahre ⁵⁶. Zur Ätiologie des CRC sind verschiedene Risikofaktoren bekannt. So ist beispielsweise das Risiko bei ballaststoffarmer, fett- und fleischreicher Kost für ein CRC erhöht, aber auch Vorerkrankungen, wie insbesondere die Colitis ulcerosa gelten als Präkanzerose des CRC. Weitere Risikoerkrankungen sind die Sprue, Karzinome von Mamma, Ovar und Corpus uteri, sowie die Schistosomiasis ¹⁰¹. Als genetische Disposition für das CRC gilt die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), die zugleich eine obligate Präkanzerose darstellt, das CRC in der Familienanamnese und das hereditäre nichtpolypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC, Lynch-Syndrom), welches ein CRC-Risiko von bis zu 80% aufweist ⁵⁶. CRC entstehen aus Epitheldysplasien, wobei 90% aller Dysplasien in Form von Adenomen auftreten. Die Tumorprogression vom Normalgewebe über das Adenom zum Karzinom dauert in etwa 10 Jahre. Voraussetzung für die Tumorbildung ist dabei, dass das Epithel genotoxisch und hereditär zur Tumorbildung „disponiert“ wird. Inzwischen wurden mindestens 5 Mutationen definiert, die zu einem CRC führen ²². Dabei handelt es sich um Aktivierungen von Onkogenen und und/oder Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen, die in einer kritischen Gesamtzahl von genetischen Veränderungen dazu führen können, dass das anfangs noch kontrollierte Wachstumsverhalten in ein unkontrolliertes malignes Wachstum übergehen kann (Abb. 1). Es gibt wie bei den meisten Tumoren des Darms keine spezifischen Symptome, die für ein CRC sprechen. Sie sind meist Folge der Tumoranämie und bestehen in Müdigkeit, körper-

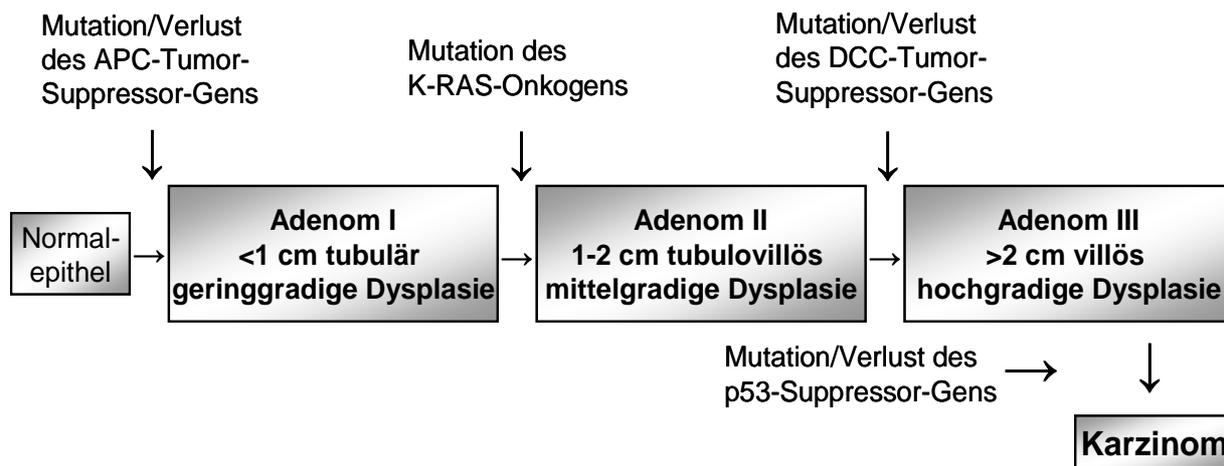


Abbildung 1: Adenom/Dysplasie-Karzinom-Sequenz. Der initiale Schritt ist die Inaktivierung des APC-Tumorsuppressor-Gens (Adenoma Polyposis Coli). Nachfolgende Mutationen des K-RAS-Onkogens führen dann zur klonalen Expansion APC-mutierter Zellen. Verlust des DCC-Tumorsuppressor-Gens (deleted in carcinoma coli) und des p53-Suppressor-Gens medieren schließlich den Übergang von benignem zu malignem Wachstum ²².

licher Leistungsminderung und Schwäche. Darüber hinaus treten gastrointestinale Symptome erst spät auf und sind zudem in geringem Maße abhängig von der Tumorlokalisation. So können beispielsweise bei einem Tumor im Colon ascendens lokale Schmerzen, Appetitlosigkeit, Übelkeit und gelegentliches Erbrechen zu der allgemeinen Schwäche, Gewichtsverlust und Anämie hinzukommen. Tumore im Colon descendens hingegen führen häufig zu Änderungen der Stuhlgewohnheiten, d.h. ein ständiger Wechsel zwischen Obstipation und Diarrhöe. Bei Wachstum eines Tumors im Rektum sind Blut- und Schleimauflagerungen im Stuhl das führende Zeichen ^{101,118}. Als „Verteilungsregel“ gilt: Rektum (60%) > Sigma (ca. 20%) > Zökum/Colon ascendens (ca.10%) > übriges Kolon (ca. 10%). Die Tumorausbreitung erfolgt durch kontinuierliches Wachstum überwiegend in oraler Richtung und durch lymphogene und hämatogene Metastasierung v.a. in Leber und Lunge. Zur Stadieneinteilung des CRC stehen drei verschiedene Klassifikationen zur Verfügung. Die UICC-Stadien, das TNM-System und die Dukes-Einteilung (Tabelle 1).

UICC-Stadium	Definition	TNM-System			Dukes
0	Carcinoma in situ	TIS	N0	M0	
I	Ia Beschränkung auf Mukosa und Submukosa	T1	N0	M0	A
	Ib Infiltration muscularis propria	T2	N0	M0	
II	Infiltration aller Wandschichten Überschreitung der Darmwand	T3	N0	M0	B
		T4	N0	M0	
III	Regionale Lymphknoten oder Infiltration der Umgebung	Tx	N1-3	M0	C
IV	Fernmetastasen	Tx	Nx	M1	D

Tabelle 1: Stadieneinteilung des CRC. TIS: Carcinoma in situ; T1-4: Ausmaß der Tumorerinfiltration; N0-3: Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung (Untersuchung von mindestens 12 regionären Lymphknoten); M0-1: Fehlende oder vorhandene Fernmetastasen; X: kann nicht beurteilt werden.

Beim histologischen Grading erfolgt die Unterscheidung in Low-grade- und High-grade-Karzinome. Die Low-grade-Karzinome G1 und G2 sind gut bzw. mäßig differenziert. Zu den High-grade-Karzinomen hingegen gehören die schlecht differenzierten muzinösen und nicht-muzinösen Adenokarzinome (G3), sowie die Siegelringzellkarzinome und die kleinzelligen und undifferenzierten Karzinome (G4)⁵⁶. Bei Verdacht auf ein CRC sollte (eine digital-rektale Untersuchung, der Nachweis okkulten Bluts im Stuhl und) eine Koloskopie durchgeführt werden (Abb. 2).

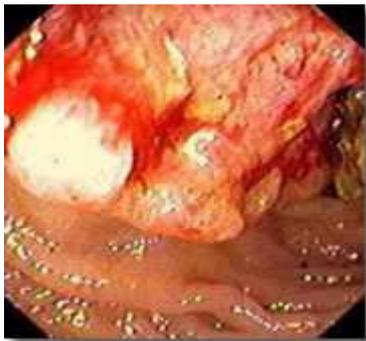


Abbildung 2: Kolonkarzinom im endoskopischen Bild (Originalabbildung aus Ref. ²²).

Bei dieser können verdächtige Areale biopsiert und feingeweblich untersucht werden. Um die Ausdehnung der Erkrankung festzustellen, sind in der Regel noch weitere radiologische Untersuchungen, wie z.B. Oberbauchsonographie, Röntgenthorax und eventuell Computertomographien oder Kernspintuntersuchungen erforderlich. Die Chirurgie ist nach wie vor der Eckstein der Therapie für derartige Tumoren, da 70-80% der Patienten einen Tumor aufweisen, der bei Diagnosestellung kurativ reseziert werden kann⁵¹. Dazu gehört die chirurgische Resektion und vollständige Lymphknotenausräumung, sowie die Operation solitärer Leber- und Lungenmetastasen. Als lokale Therapieoption bietet sich bei Metastasen, besonders in der Leber, die Chemoembolisation oder die Radiofrequenzablation an. Zur Therapie von Frühkarzinomen besteht die Möglichkeit der minimal invasiven Operation mit Hilfe der Endoskopie und, jeweils abhängig vom Stadium, die Option einer neo- oder adjuvanten Chemotherapie, die sich in der Regel aus einer Kombinationstherapie verschiedener Medikamente zusammensetzt. Dazu gehören u.a. 5-Fluorouracil (5-FU), Folinsäure, Oxaliplatin und Irinotecan. Noch in klinischer Erprobung sind monoklonale Antikörper, wie z.B. Bevacizumab und Cetuximab⁵⁶. Dennoch hat der Gebrauch aller momentan zur Verfügung stehenden Therapieoptionen nur einen bescheidenen Einfluss auf die Überlebensrate von Patienten, die sich in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung befinden. So sind zum Beispiel unbehandelte Lebermetastasen innerhalb von 5 Jahren nach Diagnosestellung fast

immer letal, und die mediane Überlebensrate von Patienten mit potentiell resezierbaren Leberläsionen, die sich keiner operativen Behandlung unterziehen, beträgt ungefähr 14,2 Monate ¹²⁹.

1.1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Unter den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) werden die Krankheitsbilder Morbus Crohn (M. Crohn) und Colitis ulcerosa zusammengefasst. Beide Krankheitsbilder weisen Gemeinsamkeiten bezüglich Genese, Krankheitsverlauf, Diagnostik und Therapie auf, allerdings besteht auch eine Reihe wesentlicher Unterschiede.

Die Inzidenz beider Erkrankungen ist ähnlich und liegt in Deutschland bei 5-10 Fällen/100.000/Jahr. Beide Erkrankungen kommen weltweit vor, sind jedoch in den westlichen Industrieländern weitaus häufiger anzutreffen als in den unterentwickelten Ländern. So ist die CED in Ländern mit schwarzer Bevölkerung sehr selten zu finden, während z.B. jüdische Weiße eine sehr hohe Inzidenz aufweisen ²². Beide Erkrankungen können in jedem Lebensalter auftreten, mit einem ersten Manifestationsgipfel zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr sowie einem zweiten niedrigeren Gipfel zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr. Das Geschlechterverhältnis ist bei M. Crohn ausgeglichen, während bei der Colitis ulcerosa die Frauen leicht überwiegen. Die Ätiologie der CED ist trotz intensiver Forschung immer noch nicht völlig geklärt. Es wird hypothesiert, dass bei genetisch prädisponierten Personen sowohl exogene Faktoren (z.B. Bakterien) als auch endogene Faktoren (z.B. eine gestörte intestinale Barrierefunktion) eine chronische Dysregulation der mukosalen Immunantwort verursachen, die durch weitere Umweltfaktoren (Ernährung, psychosomatische Ursachen) weiter verstärkt werden kann (Abb. 3). Obwohl viele Daten dafür sprechen, dass die chronische Aktivierung des mukosalen Immunsystems durch ein infektiöses Agens ausgelöst wird, konnte dieses bisher nicht identifiziert werden. Als Ursache für die CED wird daher gegenwärtig eine inadäquate Immunantwort auf die endogene mikrobielle Darmflora z.T. mit Charakteristika von Autoimmunität angesehen. Pathologische Untersuchungen erlauben eine grobe Bestimmung der pathogenetischen Abläufe im Rahmen der CED. Diese läuft in drei Schritten ab ^{2,56}:

1. Unbekannte Auslöser aktivieren lymphatische Zellen der Darmwand (bei M. Crohn vorwiegend TH1- und TH17-Lymphozyten, bei Colitis ulcerosa vorwiegend TH2-Lymphozyten)

2. Bildung von Entzündungsmediatoren (IL-1 β , TNF- α , IL-6)
3. Ausbildung lokaler Gewebsschädigungen mit Erosionen, Nekrosen und Ulzerationen

In einer vor kurzem veröffentlichten Studie wurde nachgewiesen, dass interessanterweise die Expression von CCR6 zur Identifikation von TH17-Zellen beitragen kann. Um nun eine Unterscheidung zwischen TH1- und TH17-Zellen zu treffen, konnte gezeigt werden, dass die TH1-Zellen CCR6 und CXCR3 exprimieren, während CCR6 in Kombination mit CCR4 in TH17-Zellen exprimiert wird² (Abb. 3).

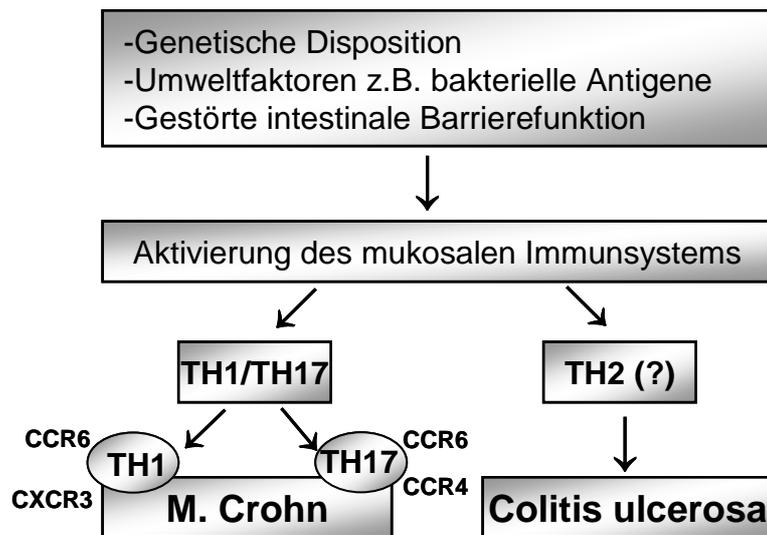


Abbildung 3: Sowohl genetische als auch Umweltfaktoren spielen bei der Pathogenese der CED eine wichtige Rolle. Während der M. Crohn eine TH1/TH17-vermittelte Entzündung ist, scheint die Colitis ulcerosa vor allem TH2-vermittelt zu sein. (Abbildung nach Vorlage aus Ref. ²).

Außerdem wurden kürzlich 3 Polymorphismen im CARD15-Gen auf Chromosom 16 nachgewiesen, die das Risiko an M. Crohn oder Colitis ulcerosa zu erkranken bei Heterozygoten um das 2,5-fache und bei Homozygoten um das bis zu 40-fache erhöhen. Dieses Genprodukt CARD15/NOD2 ist ein insbesondere auf Makrophagen exprimierter „pattern recognition receptor“, der bei der Erkennung von bakteriellem Muramylpeptidoglykan, einem Peptidoglykan, und damit sehr wahrscheinlich bei der Aufrechterhaltung der an sich physiologischen Toleranz gegenüber der Darmflora eine Rolle spielt^{56,118}. In der Tabelle 2 sind weitere Gene aufgeführt, für die in kürzlich veröffentlichten Studien eine Assoziation zu den CED festgestellt wurde. So kodiert beispielsweise das ATG16L1 Gen für ein Protein in dem autophagosomalen Transduktionsweg. Hierfür wurden statistisch signifikante Interaktionen mit Bezug auf das Risiko für M. Crohn zwischen dem Marker rs22441880 und dem bereits

etablierten CARD15-Gen gefunden ⁵⁵. Das Fehlen einer Assoziation zwischen rs22441880 und der Colitis ulcerosa lässt vermuten, dass der zugrunde liegende biologische Prozess spezifisch für M. Crohn sein könnte ⁵⁵.

Suszeptibilitätsgene für M. Crohn
CARD15/NOD2
OCTN1
IL23R
ATG16L1
TLR4
IRGM

Tabelle 2: Genetische Faktoren mit Assoziation zu den CED ^{28,34,55,110,147}

Um weitere, mit CED-assoziierte Polymorphismen zu identifizieren, wurde das humane Genom für Nukleotidpolymorphismen gescannt ³⁴. Dabei zeigte sich eine Variante des Gens, das für den IL-23-Rezeptor (IL23R) kodiert und zusätzlich einen starken Schutz gegen M. Crohn verleiht (Abb. 4) ¹⁰². Im Gegensatz dazu waren mehrere nicht-kodierende Varianten des Gens für IL-23R unabhängig mit M. Crohn assoziiert.

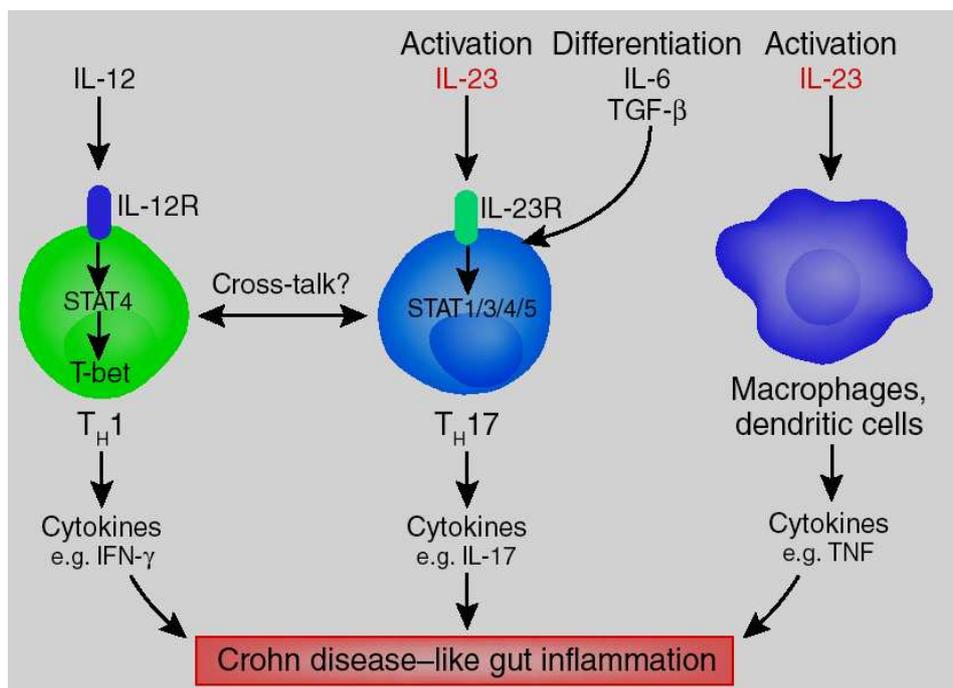


Abbildung 4: Aktuelles Modell zur Pathogenese von M. Crohn. Frühere Studien favorisierten den IL-12-Signalweg als zentrale Rolle in der TH1-vermittelten intestinalen Entzündung. Mehrere, kürzlich veröffentlichte Studien heben allerdings die Rolle des IL-23-Signalweges für die Aktivierung von TH17-Zellen hervor. IL-12 führt durch den Transkriptionsfaktor STAT4 zur Phosphorylierung, wohingegen IL-23 durch die Bindung an seinen Rezeptor die STAT1/3/4/5-Phosphorylierung induziert. T-bet ist der Haupttranskriptionsfaktor für TH1-Zellen im Darm. Sowohl TH1-, als auch TH17-Zellen können eine Aktivierung des gemeinsamen Signalweges verursachen, der durch eine Zytokin-vermittelte Darmzerstörung charakterisiert ist (Originalabbildung aus Ref. ¹⁰²).

Obwohl die funktionellen Konsequenzen der einzelnen Varianten noch ermittelt werden müssen, stehen hierfür bereits verschiedene Möglichkeiten zu Verfügung. So könnten beispielsweise „loss-of-function“-Mutationen des IL23R die Aktivierung von pathogenetischen Effektor-T-Zellen bei M. Crohn-Patienten unterdrücken. Alternativ betrachtet, könnte ein gehemmter IL23R-Signalweg die initiale Immunantwort tiefgreifend beeinflussen. IL-23R ist ebenfalls auf der Oberfläche von Makrophagen und DC lokalisiert und kann dadurch eine Kontrollfunktion und Immunantwort gegen die Mikroflora des Darms übernehmen¹⁰². Dies ist übereinstimmend mit der Hypothese, dass IL-23 für die Darmentzündung via angeborene Immunmechanismen in T-Zell-defizienten Tieren erfordert wird¹⁴⁹. In der Abbildung 5 sind die einzelnen Schritte der CED-Pathogenese nach neuesten Erkenntnissen nochmals aufgeführt⁸.

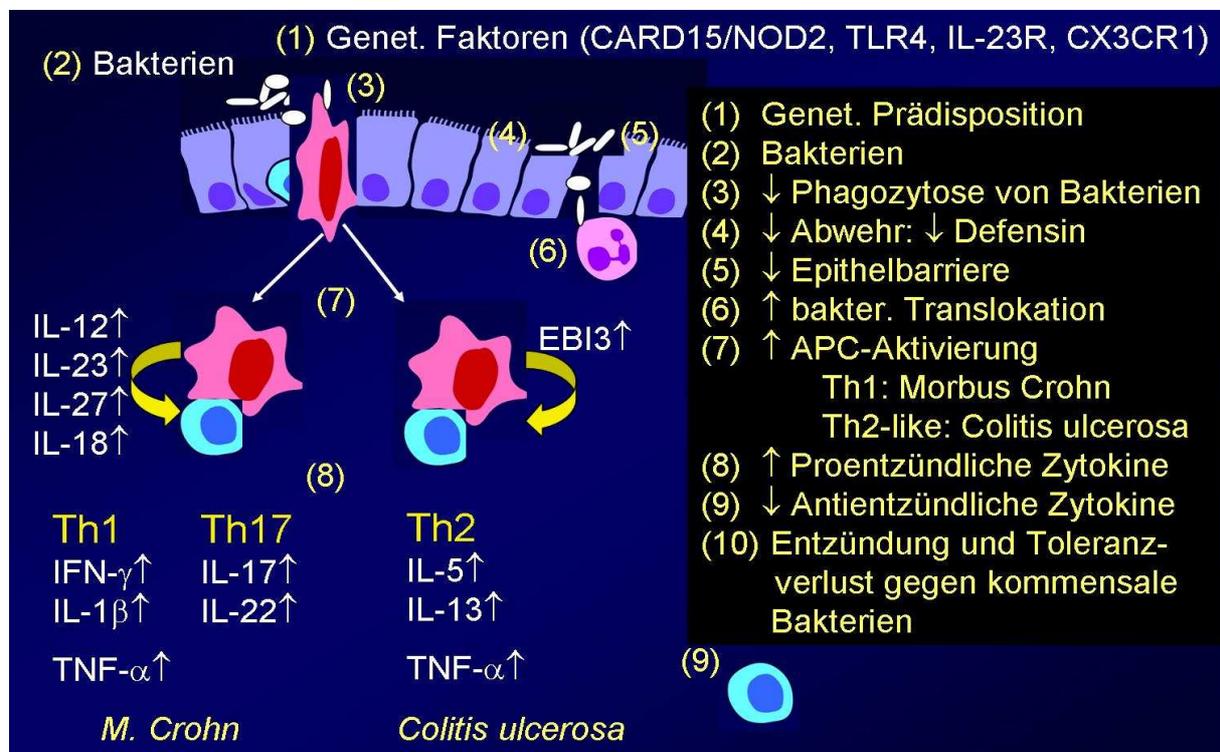


Abbildung 5: Zusammenfassung der CED-Pathogenese nach heutigen Erkenntnissen (Originalabbildung aus Ref.⁸).

Die Auswirkungen der verschiedenen genetischen Faktoren auf M. Crohn und Colitis ulcerosa sind somit noch nicht vollständig geklärt. Beide Erkrankungen weisen aber bezüglich ihres Befallsmusters deutliche Unterschiede auf. Beim M. Crohn besteht eine Entzündung des Darms, der alle Abschnitte des Verdauungstrakts vom Mund bis zum Anus betreffen kann. Mit 30% ist die Lokalisation im terminalen Ileum am häufigsten. Am zweithäufigsten mit 25% ist das Kolon befallen, und Ileum und Kolon zusammen sind in 45% der Fälle betroffen. Nur 10% der Fälle manifestieren sich oberhalb des Jejunums und weniger als 1% im Ösophagus und Mund¹⁰¹. Die Colitis

ulcerosa dagegen ist eine Erkrankung, die ausschließlich das Kolon befällt, selten allerdings auch als backwash-Ileitis auftreten kann. Sie breitet sich vom Rektum beginnend nach proximal hin aus. Daher ist das Rektosigmoid allein in 40% der Fälle betroffen und das linksseitige Hemikolon ebenfalls in 40% der Fälle. Eine Pankolitis tritt in 20% der Fälle auf ¹⁰¹. In Hinblick auf die Klinik sind Patienten mit Morbus Crohn u.a. von starken Abdominalschmerzen, Diarrhöen und extraintestinalen Manifestationen wie Arthritis, Augenerkrankungen und einem Befall der Haut, wie z.B. das Erythema nodosum, betroffen. Diese extraintestinalen Manifestationen können auch bei der Colitis ulcerosa auftreten, allerdings nur in seltenen Fällen, wie z.B. die sklerosierende Cholangitis. Die entzündlichen Veränderungen bei M. Crohn können die gesamte Darmwand umfassen, wobei es in Phasen hoher entzündlicher Aktivität zur Ausbildung von Ulzera, Granulomen, Stenosen und gelegentlich zur Ausbildung von Fisteln kommt. Die Colitis ulcerosa verläuft chronisch-rezidivierend oder chronisch-kontinuierlich und ist symptomatisch meist durch blutig-schleimige Diarrhöen und Tenesmen gekennzeichnet. Während die Tunica muscularis stets entzündungsfrei ist, führt der Befall der Mukosa und Submukosa meist zur Ausbildung von Ulzera, Krypten-Abszessen und entzündlichen Pseudopolypen. Die Diagnose der CED stützt sich auf Klinik, Labor sowie auf makro- und mikroskopischen Befunde der Endoskopie (Abb. 6, 7) und Histologie.

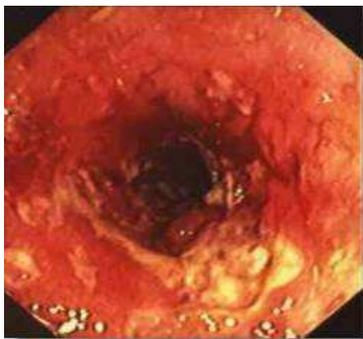


Abbildung 6: Colitis ulcerosa. Schleimbedeckte oberflächliche Ulzerationen. Aufgehobene Haustrierung. Starrer Darm mit fehlender Peristaltik während der Koloskopie.

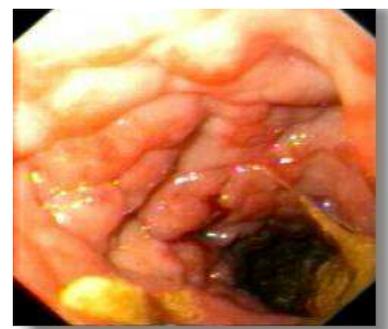


Abbildung 7: M. Crohn. Stenotisch verändertes Sigma mit typischen Pflastersteinrelief durch mehrere, teilweise konfluierende Ulzerationen. Dazwischen finden sich Areale von normaler Schleimhaut.

Bei einer Pankolitis ist nach langjähriger Krankheitsdauer, wie bereits oben erwähnt, auch eine erhöhte Inzidenz zu dysplastischen Veränderungen der Darmschleimhaut

und der Entstehung von Karzinomen gegeben. Da die Laborbefunde zumeist aber nur das Entzündungsgeschehen reflektieren, sind sie für keine der beiden Erkrankungen spezifisch. Neben der Endoskopie besteht die Möglichkeit der bildgebenden Verfahren wie z.B. die Röntgenkontrastdarstellung des Dünndarms nach Sellink zum Nachweis eines Dünndarmbefalls, einer Stenose oder einer Fistel. In der Tabelle 3 sind nochmals als Übersicht die einzelnen Punkte zur Abgrenzung von der Colitis ulcerosa und M. Crohn aufgeführt.

	Colitis ulcerosa	M. Crohn
Lokalisation	auf Kolon beschränkt, Rektum stets befallen	kann gesamten Verdauungstrakt befallen
endoskopisches Aussehen	kontinuierliche Entzündung; unscharf begrenzte flache Ulzerationen; Pseudopolypen	diskontinuierliche Entzündung; scharf begrenzte tiefe Ulzerationen; Pflastersteinrelief
Histologie	auf Schleimhaut und Submukosa begrenzt; Kryptenabszesse; entzündliches Infiltrat der Lamina propria	transmuraler Befall; nicht-verkäsende Granulome; entzündliches Infiltrat der Darmwand
Klinik	schleimig-blutige Diarrhoe; Tenesmen; keine perianalen Erscheinungen	Abdominalschmerzen und Diarrhoe (nur selten blutig); perianale Erscheinungen
Verlauf	oft akuter Beginn, Verlauf in Schüben, teilweise mit kompletten Remissionen; seltener chronisch-kontinuierlicher Verlauf	oft schleichender Beginn, Verlauf in Schüben mit inkompletten Remissionen
extraintestinale Manifestationen	seltener als bei M. Crohn, sklerosierende Cholangitis kommt vor	häufiger als bei Colitis ulcerosa, sklerosierende Cholangitis kommt nicht vor
Komplikationen	toxisches Megakolon, schwere Blutungen, Kolonkarzinom	Fisteln, Stenosen, Abszesse, Strikturen
Therapie	operative Resektion ist kurativ	keine operative Heilung möglich; operative Therapie oft komplikationsreich

Tabelle 3: Übersicht: Abgrenzung von Colitis ulcerosa und M. Crohn (aus Ref. ¹¹⁸).

Die konservative Therapie der CED beruht auf zwei Pfeilern. Einerseits die Behandlung des akuten Schubs mit Diät, Glukokortikoiden und in schweren Fällen mit Immunsuppressiva (Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Ciclosporin, evtl. Methotrexat), andererseits der Dauerbehandlung v.a. mit 5-Amino-Salizylaten zur Verhinderung von Rezidiven. Die Standardtherapie besteht oftmals in der notwendigen Langzeitgabe von Immunsuppressiva, wobei aber auch kurzzeitig Glukokortikoide eingesetzt werden können. Beide Therapieverfahren sind mit erheblichen Nebenwirkungen, wie z.B. Morbus Cushing, Knochenmarksdepression, Pankreatitis und Nierenversagen verbunden. Neben der konservativ-medikamentösen Therapie ist nicht selten eine chirurgische Intervention notwendig. Die meisten M. Crohn-Patienten (~70%) benötigen im Laufe ihres Lebens zumindest einen chirurgischen

Eingriff. Eine Heilung der Colitis ulcerosa kann bisher nur durch die Kolektomie erreicht werden.

1.2 Chemokine und Chemokin-Rezeptoren

1.2.1 Chemokine

Das intestinale Epithel bildet die wichtigste Barriere zwischen Bakterien und Antigenen des Darmlumens einerseits und Immunzellen der Lamina propria andererseits. Die intestinalen Epithelzellen (IEC) sind ständig der Mikroflora des Darms ausgesetzt und produzieren im Rahmen dieser Antigen-Epithelzell-Interaktionen eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen. Chemokine sind Zytokine mit chemoattraktiver Wirkung („chemoattractant cytokines“) und bilden eine Protein-Familie mit konservierten Cystein-Strukturen, die an Disulfidbrücken gebunden sind (Abb. 6). Sie können in vier verschiedene Sub-Klassen eingeteilt werden: CXC-, CC-, C- und CX3C-Chemokine, wobei mit „C“ Cystein und mit „X“ eine andere Aminosäure als Cystein bezeichnet wird (Abb. 6). Chemokine werden vor allem im Thymus, im sekundären Lymphgewebe und in epithelialen Zellen (wie z.B. IEC) gebildet wobei sie eine erstaunliche Diversität bezüglich ihrer Ziel-Zellen zeigen. Die chemotaktische Aktivität steht in direkter Beziehung zur Chemokin-Struktur. So werden z.B. CXC-Chemokine in zwei Untergruppen eingeteilt: Chemokine mit der N-terminalen Sequenz Glutaminsäure-Leucin-Arginin, die auf Neutrophile, und Chemokine ohne diese Sequenz, die auf Leukozyten wirken (Abb. 8). Dagegen wirken CC-Chemokine vor allem auf Monozyten, Eosinophile und aktivierte T-Zellen und nicht auf Neutrophile und B-Zellen⁸⁹ (Abb. 8). Chemokine unterstützen die transendotheliale Migration von Leukozyten, insbesondere unter Bedingungen von Infektion und Entzündung³¹. Bestimmte Chemokine modulieren außerdem die Angiogenese und spielen eine Rolle bei der Hämatopoese und Embryogenese. Untersuchungen sprechen dafür, dass bestimmte Chemokine auch die Migration von (Chemokin-Rezeptor-exprimierenden) IEC beeinflussen¹⁰. Diese Beobachtung wird von der Tatsache unterstützt, dass bestimmte Chemokine (wie z.B. SDF-1 α /CXCL12) maßgeblich an der Organ-spezifischen Metastasierung epithelialer Tumore beteiligt sind⁹⁷. Der CC-Chemokin-Ligand (CCL)20 (MIP-3 α , LARC, Exodus) wird primär vom Darmepithel, besonders im Deckepithel der Peyer'schen Plaques gebildet, wo er die lokale Migration von dendritischen Zellen (DC) und die Expression seines Rezeptors CCR6 bewirkt^{66,143}, aber auch in Leber,

Lunge, Appendix und den Tonsillenkrypten^{32,57,64,89,143}. CCL20 zeigt eine niedrige Sequenzähnlichkeit mit anderen humanen CC-Chemokinen.

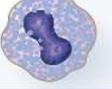
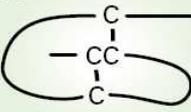
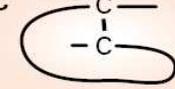
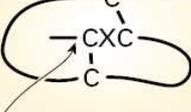
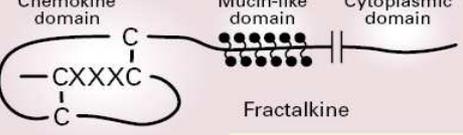
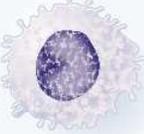
	Chemokine	Receptor	Cell Type
			
	MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES	CCR1 CCR3	Eosinophil 
	MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES	CCR2 CCR3	Basophil 
CC 	MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES I-309 MDC, HCC-1, TECK	CCR1 CCR2 CCR5 CCR8 ?	Monocyte 
	Fractalkine	CX ₃ CR1	
	SDF-1	CXCR4	
	MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 TARC MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES MIP-3 β (ELC) PARC, SLC, 6CKine (Exodus-2)	CCR1 CCR2 CCR4 CCR5 CCR7 ?	Activated T cell 
Fractalkine	CX ₃ CR1		
IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3		
C 	PARC, DC-CK1	?	Resting T cell 
	Lymphotactin	?	
	SDF-1	CXCR4	
CXC 	MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES TARC MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES MIP-3 α (LARC, Exodus-1) MDC, TECK	CCR1 CCR2 CCR3 CCR4 CCR5 CCR6 ?	Dendritic cell 
	SDF-1	CXCR4	
	Glutamic acid-leucine-arginine [Interleukin-8, GCP-2 Interleukin-8, GCP-2; GRO- α , - β , - γ ; ENA-78; NAP-2; LIX	CXCR1 CXCR2	Neutrophil 
CXXXC 	MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES	CCR2 CCR5	Natural killer cell 
	Fractalkine	CX ₃ CR1	
	IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	

Abbildung 8. Chemokine, Chemokin-Rezeptoren und ihr Haupteffektorzellen (Originalabbildung aus Ref.⁸⁹).

Die größte Gemeinsamkeit besteht mit dem CCL21/sekundären lymphoiden Gewebechemokin (31% Identität)^{164,166}. Das gebildete CCL20-Protein von 70

Aminosäuren hat eine relative Masse von 8025, einen isoelektrischen Punkt von 9,7 und beinhaltet charakteristisch für CC-Chemokine vier Cysteine ¹³³.

1.2.2 Chemokin-Rezeptoren

Chemokine vermitteln ihre Effekte über G-Protein-gekoppelte, so genannte „Sieben Transmembran-Rezeptoren“. Die Chemokin-Rezeptoren-Familie lässt sich in vier Subfamilien - entsprechend der gebundenen Liganden - einteilen: Derzeit sind 10 CC-Chemokin-Rezeptoren (CCR1-10), 6 CXC-Rezeptoren (CXCR1-6), ein XC-Rezeptor (XCR1/Lymphotactin-Rezeptor) und ein CX3C-Rezeptor (CX3CR1/ Fractalkin-Rezeptor) bekannt (Abb. 9).

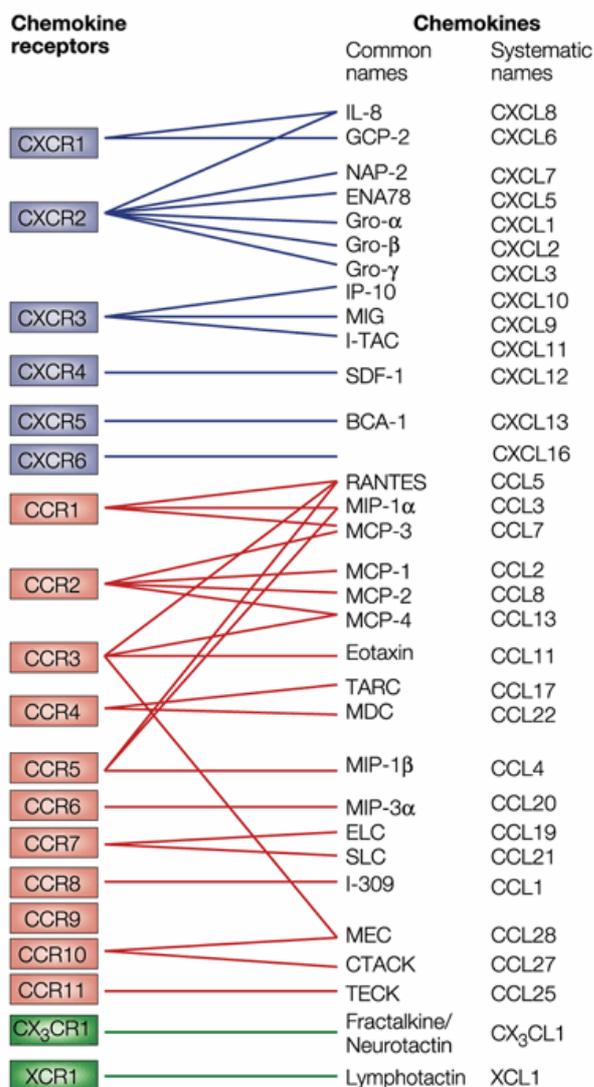


Abbildung 9. Übersicht über die verschiedenen Chemokin-Rezeptoren und deren Liganden mit „historischer“ Bezeichnung („common names“) und systematischen Namen („systematic names“).

Bedeutung der Abkürzungen für „common names“: BCA-1, B-cell-attracting chemokine 1; CTACK, cutaneous T-cell-attracting chemokine; ELC, Epstein-Barr-virus-induced gene 1 ligand chemokine; ENA78, epithelial-cell-derived neutrophil-activating peptide 78; GCP-2, granulocyte chemotactic protein 2; Gro, growth-regulated oncogene; IL-8, interleukin 8; IP-10, interferon-inducible protein 10; I-TAC, interferon-inducible T-cell chemoattractant; MCP, monocyte chemoattractant protein; MDC, macrophage-derived chemokine; MEC, mucosae-associated epithelial chemokine; MIG, monokine induced by interferon ; MIP, macrophage inflammatory protein; NAP-2, neutrophil-activating peptide 2; RANTES, regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted; SDF-1, stromal-cell-derived factor 1; SLC, secondary lymphoid-tissue chemokine; TARC, thymus and activation-regulated chemokine; TECK, thymus-expressed chemokine. (Originalabbildung aus Ref. ¹⁶⁷)

Während für Chemokin-Rezeptoren eine einheitliche, auf der Chemokin-Struktur beruhende Nomenklatur existiert (z.B. CXCR1), gibt es für Chemokine eine neuere systematische und strukturbezogene Nomenklatur (z.B. CXCL8), sowie eine ältere

Nomenklatur, die auf den Namen der Erstbeschreibungen beruht (z.B. IL-8, siehe Abb. 8).

1.2.3 Chemokin-induzierte Signaltransduktionswege

Durch die Bindung ihrer Liganden werden Chemokin-Rezeptoren aktiviert. Die Rezeptoren übertragen ihre Signale zu heterotrimeren G-Proteinen. Die dissoziierten $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten können bestimmte Enzyme wie z.B. die Phospho-Inositol-3-Kinase (PI3-Kinase) und die ERK-MAP-Kinasen binden und aktivieren. Wichtige Signaltransduktionswege, deren Aktivierung für mehrere Chemokin-Systeme gezeigt werden konnte, sind in Abbildung 10 dargestellt. Diese Enzyme generieren intrazelluläre Signal-Mediatoren, die eine biologische Antwort der entsprechenden Zelle auf das Chemokin-Rezeptor-Signal auslösen.

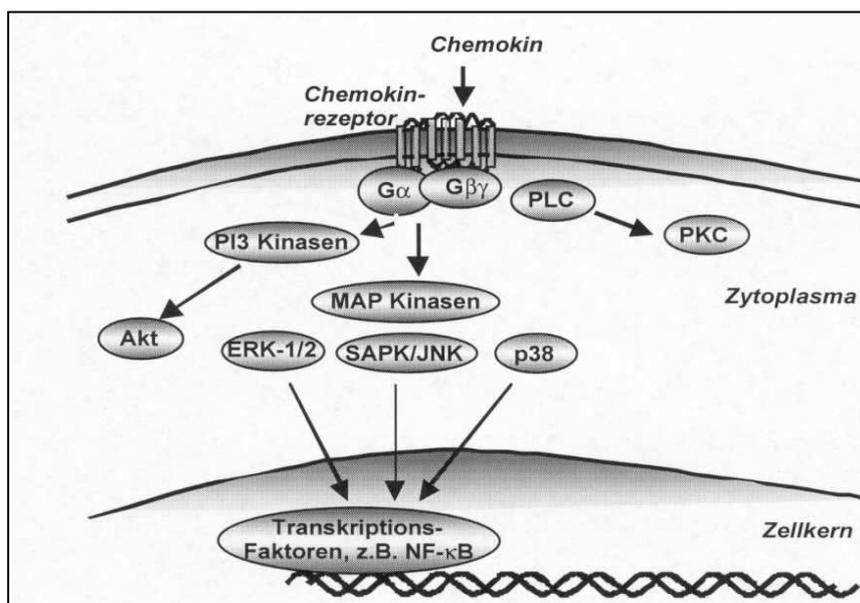


Abbildung 10. Darstellung der wichtigsten Chemokin-induzierten Signaltransduktionswege (Abbildung nach Vorlage aus Ref. ¹⁴⁴).

1.3 Das CCL20-CCR6-Chemokin-Ligand-Rezeptor-System

CCL20, alternativ auch liver and activation-regulated chemokine (LARC), macrophage protein-3 α (MIP-3 α) oder Exodus-1 genannt, ist das bisher einzig bekannte Chemokin, das mit dem CC-Chemokin-Rezeptor 6 interagiert. Trotz der Bezeichnung LARC konnte eine konstitutive Expression von CCL20 in verschiedenen Geweben durch den Einsatz von kommerziellen Multi-Gewebe Northern-Blot-Filtern gezeigt werden¹³³. Eine deutliche Expression von konstitutivem CCL20 wurde in einer Vielzahl von normalem humanem Mukosa-assoziierten Gewebe nachgewiesen¹³. Hervorzuheben sind hier besonders die IEC von Appendix und Kolon^{66,143}. Immunhistochemische Färbungen von gesundem humanen Kolon zeigen die Präsenz von CCR6-Proteinen auf mukosalen T-Zellen und auf anderen mononukleären Zellen, besonders den Monozyten^{33,64,123,143}. Die Expression von CCL20 in diesem breiten Spektrum von Zell- und Gewebetypen, sowie die Vielfalt von CCL20-induzierenden Substanzen, lässt darauf schließen, dass CCL20 und CCR6 sowohl in normalen, als auch in pathologischen Prozessen, betreffend vor allem die epitheliale Oberfläche, involviert sind. Zu nennen sind hier besonders die Haut und die Mukosa unter entzündlichen Bedingungen. Das Ligand-Rezeptor-Paar CCL20/CCR6 ist verantwortlich für die Chemoattraktion von unreifen DC bei intestinaler Entzündung oder Antigen-Stimulation¹⁹, sowie für die Chemoattraktion von Effektor-Gedächtnis-T- und B-Zellen. Die Gegenwart von inflammatorischen Mediatoren und bakterieller Invasion verursachen eine Steigerung von CCL20-mRNA und CCL20-Proteinexpression in Epithelzellen sowohl in vivo, als auch in vitro^{43,67,130}. Darüber hinaus produzieren Kolonepithelzellen von Patienten mit entzündlicher Darmerkrankung einen höheren Spiegel von CCL20 als normale Enterozyten^{64,69,80}. Allerdings gibt es bisher keine genaueren Analysen dieses Chemokin-Systems bei CED. Myeloide DC aus Peyer-Plaques migrieren in vitro zu CCL20 sowie zur T-Zell-reichen interfollikulären Region von Peyer-Plaques nach mikrobieller Stimulation in vivo.

In Mäusen wird CCL20 konstitutiv im mukosalen Gewebe exprimiert, besonders im Follikel-assoziierten Epithel, das über der Domregion von Peyer'schen Plaques liegt^{24,38,64,124,152}. Bei Entzündungen wird die Expression von CCL20 gesteigert, wie auch nach einer Injektion von LPS, IL-1 β oder TNF- α gezeigt werden konnte^{43,143}. Neue Ergebnisse von CCR6-Knockout-Mäusen zeigen noch deutlicher die Bedeutung von CCL20 und CCR6 in der mukosalen Immunität auf, sowohl unter

hämostatischen, als auch unter inflammatorischen Bedingungen. CCR6-Knockout-Mäuse weisen eine abgeschwächte Immunantwort in Bezug auf oral verabreichte Antigene und enteropathogene Rotaviren auf und besitzen keine DC in den Peyer-Plaques²⁴.

Obwohl CCL20, wie bereits anfangs erwähnt, den Rezeptor CCR6 nicht mit anderen Chemokinen teilt, haben Untersuchungen gezeigt, dass die humanen β -Defensine-1 und -2 (hBD) ebenfalls CCR6 binden und aktivieren können⁶². Abbildung 11 zeigt die beiden CCR6-Liganden in ihrer 3D-Struktur.

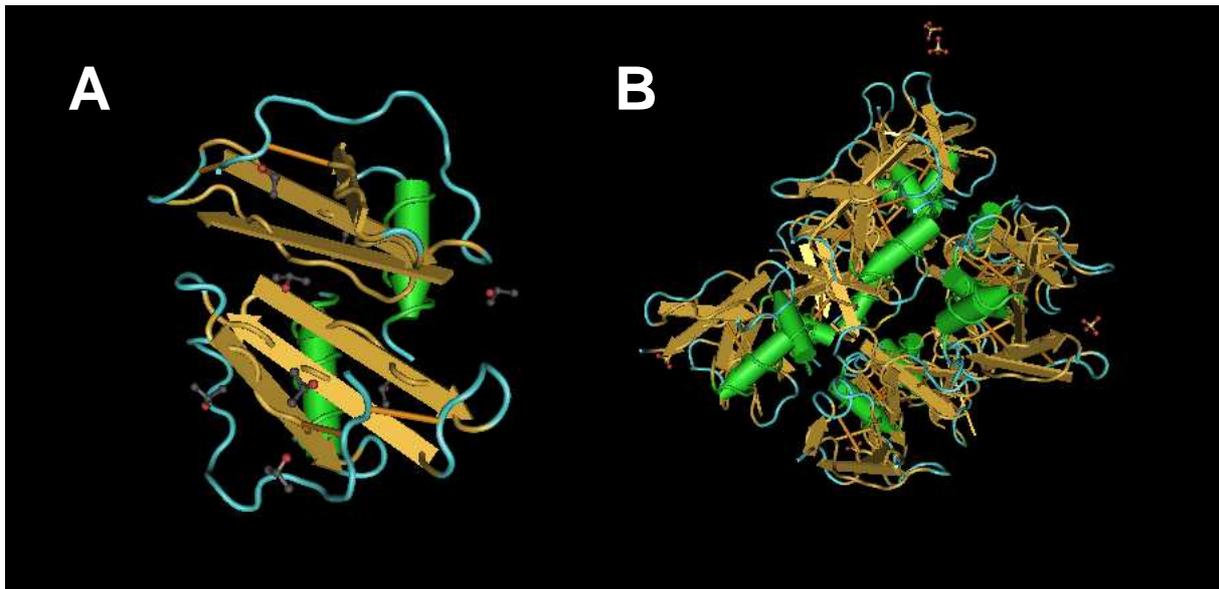


Abbildung 11: 3D-Strukturen der CCR6 Liganden. **A:** Humanes β -Defensin-2. **B:** CCL20 (Abbildung nach Vorlage aus Ref. ¹¹¹).

Humane Defensine sind kationische, cysteinreiche antimikrobielle Peptide, die Komponenten des angeborenen Immunsystems darstellen und somit die intestinale Mukosa gegen bakterielle Invasion schützen. Sie werden von humanen Kolonepithelzellen gebildet, wobei jedoch die Paneth'schen-Körnerzellen des Duodenums die Hauptquelle für die antimikrobiellen Peptide im Intestinum zu sein scheinen¹⁰⁵. Die Pathogenese von CED wird, wie bereits erwähnt, auch zu einem gewissen Grad intestinalen Bakterien zugeschrieben, die eine Entzündung der Darmmukosa bei genetisch suspekten Patienten initiieren und aufrecht erhalten können¹⁵⁷. Es wird angenommen, dass eine verminderte Anzahl der hBD-2 Genkopien für CED prädisponierend ist, höchstwahrscheinlich durch eine reduzierte β -Defensin-Expression verursacht⁴¹.

1.4 Die Rolle von Chemokinen bei chronisch entzündlichen Darm-erkrankungen und kolorektalem Karzinom

1.4.1 Der Einfluss der Chemokine bei der Kanzerogenese

Für Chemokine und ihre Rezeptoren konnte kürzlich gezeigt werden, dass sie bei allen Stadien der Tumorentwicklung und Tumorprogression agieren, einschließlich der neoplastischen Transformation von Zellen und der Förderung anomaler Angiogenese. Zusätzlich sind Chemokine an der Passage von Tumorzellen durch die extrazelluläre Matrix beteiligt und können das Tumorwachstum durch zahlreiche verschiedene Mechanismen beeinflussen. Dazu gehört zum Beispiel, dass sie als autokrine oder parakrine Wachstumsfaktoren fungieren, Angiogenese oder Angiostasis induzieren, die Metastasierung regulieren und eine Rolle bei der Immunantwort gegen Tumorzellen spielen. Neueste Ergebnisse zeigen, dass Tumorzellen Chemokin-vermittelte Mechanismen benutzen, die ähnlich zu denen sind, die den Leukozytentransport während der Metastasierung regulieren⁹⁷. So konnte bereits in einer Studie gezeigt werden, dass die Signalwirkung durch CCR6 eine Aktinpolymerisation und eine Pseudopodien-Formation in Lungenkarzinomzellen vermittelt⁹⁷. Der Einfluss von CCR6 bei der Metastasierung ist allerdings nicht nur auf das Lungenkarzinom limitiert. Die Expression von CCR6 ist auch in zahlreichen anderen Tumorzelllinien zu finden. Dazu gehören beispielsweise das Prostatakarzinom^{27,139}, das B-Zell-Lymphom²³, das Glioblastom¹³⁵, die chronisch lymphatische Leukämie¹⁵ und eben auch das CRC^{36,71}. Der Mechanismus der CCR6-Signalwirkung und seine funktionelle Rolle in der Migration und Metastasierung der CRC-Zellen sind zentrale Fragen bei der Analyse der kolorektalen Kanzerogenese. Da bestimmte Chemokine zusätzlich eine begrenzte Antitumorwirkung zu zeigen scheinen, wurden neue Denkansätze entwickelt, die ein Chemokin mit einem bestimmten Zytokin kombinieren, wie z.B. dem IL-2, IL-12 oder dem GM-CSF, die alle für ihre stimulierenden Eigenschaften auf T-Zellen, natürliche Killerzellen oder tumor-antigenen DC bekannt sind. Chemokine könnten somit potente natürliche Adjuvantien für eine Antitumor-Immuntherapie sein. Die Hauptpfade, die von Chemokinen benutzt werden, um das Tumorwachstum zu beeinflussen, sind in Abbildung 12 beschrieben.

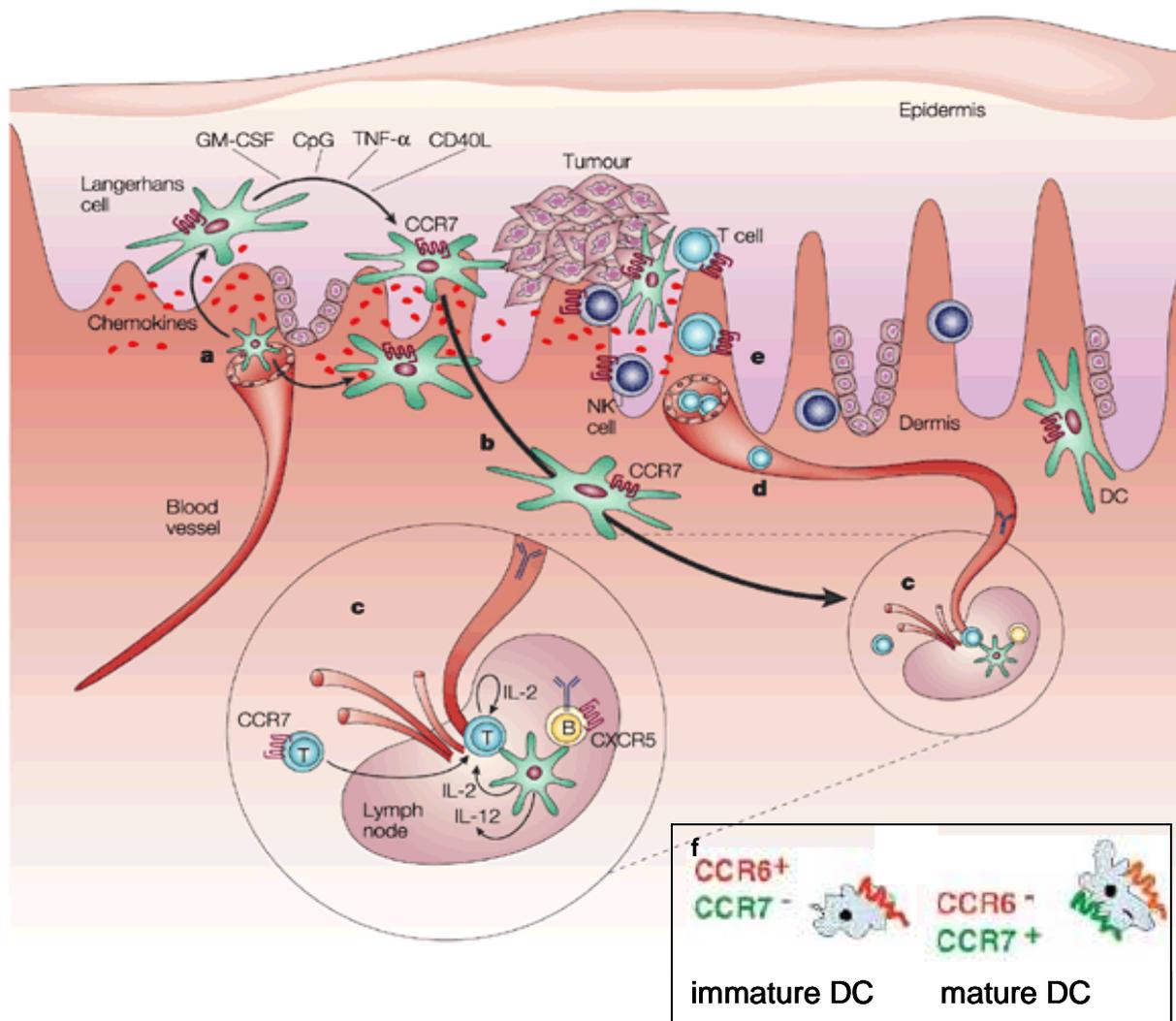


Abbildung 12: Chemokine instrumentieren die Immunantwort in der Pathogenese des Karzinoms. **a:** DC wandern vom Blut aus in das periphere Gewebe. **b:** In einem unreifen Stadium exprimieren die verschiedenen Untertypen der DC hohe Spiegel von endozytischen Rezeptoren und besitzen somit eine potente Antigen-Absorptions-Kapazität. Die Zellen reagieren auf Liganden und verwenden höchstwahrscheinlich Chemokin-Rezeptoren, wie zum Beispiel CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CCR9 und CXCR4, um die periphere Seite zu passieren. Durch Aktivierung (z.B. durch GM-CSF, CpG, TNF- α oder CD40L) an der epithelialen Oberfläche oder innerhalb des Stromagewebes verändern sie ihren Phänotyp und steigern die CCR7-Expression, um in die afferenten Lymphgefäße einzudringen und in Richtung des zu drainierenden Lymphknotens zu wandern. **c:** Innerhalb der Lymphknoten exprimieren reife DC hohe Spiegel an kostimulatorischen Molekülen, produzieren Zytokine (IL-12) und präsentieren erfolgreich Antigene den T-Zellen, die ähnliche CCR7-vermittelte Mechanismen verwenden, um in die T-Zell-Zone des lymphatischen Gewebes einzudringen. Aktivierte antigen-spezifische T-Zellen bilden das Zytokin IL-2, das die T-Zell-Proliferation induziert und sich einem zytokingesteuerten (z.B. IL-12) Differenzierungsprozess in Gedächtnis-/Effektorzellen unterzieht. Zusätzlich interagieren diese antigen-getriggerten DC mit B-Zellen, die CXCR5 abhängige Signaltransduktionswege in Richtung des lymphatischen Gewebes verwenden. **d:** Antigen-spezifische T-Gedächtnis-Zellen rezirkulieren und benutzen Chemokin-vermittelte Mechanismen, um zum Ort der Verletzung, der Infektion oder des Tumorwachstums zu gelangen. **e:** Eine Reihe von homöostatischen und inflammatorischen Chemokinen, einschließlich der Liganden für CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR3 und CXCR4, können ein Milieu erzeugen, welches die Extravasation von Gedächtnis- und Effektorzellen des Immunsystems induziert. **f:** Unreife DC sind durch CCR6-Expression und fehlende CCR7-Expression charakterisiert, während reife DC CCR7, aber nicht CCR6 exprimieren (Originalabbildung modifiziert aus Ref. ^{32,58}).

1.4.2 Chemokine in der intestinalen Entzündung

Ein entscheidendes Kennzeichen mukosaler Entzündung, wie sie bei Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa zu finden ist, sind infiltrierende Leukozyten in der Darmmukosa. Das Rekrutieren von Leukozyten erfordert eine interzelluläre Kommunikation zwischen infiltrierenden Leukozyten, Endothelzellen, Stromazellen und Epithelzellen. Diese Zellkommunikation wird durch Zytokine, Zelladhäsionsmoleküle (Selektine/Integrine) und Chemokine ermöglicht. Chemokine haben in dem Schema „rolling, adhesion, transmigration“ (Abb. 13) eine zentrale Rolle, da sie auf fast allen Ebenen des Prozesses der Extravasation immunkompetenter Zellen eingreifen.

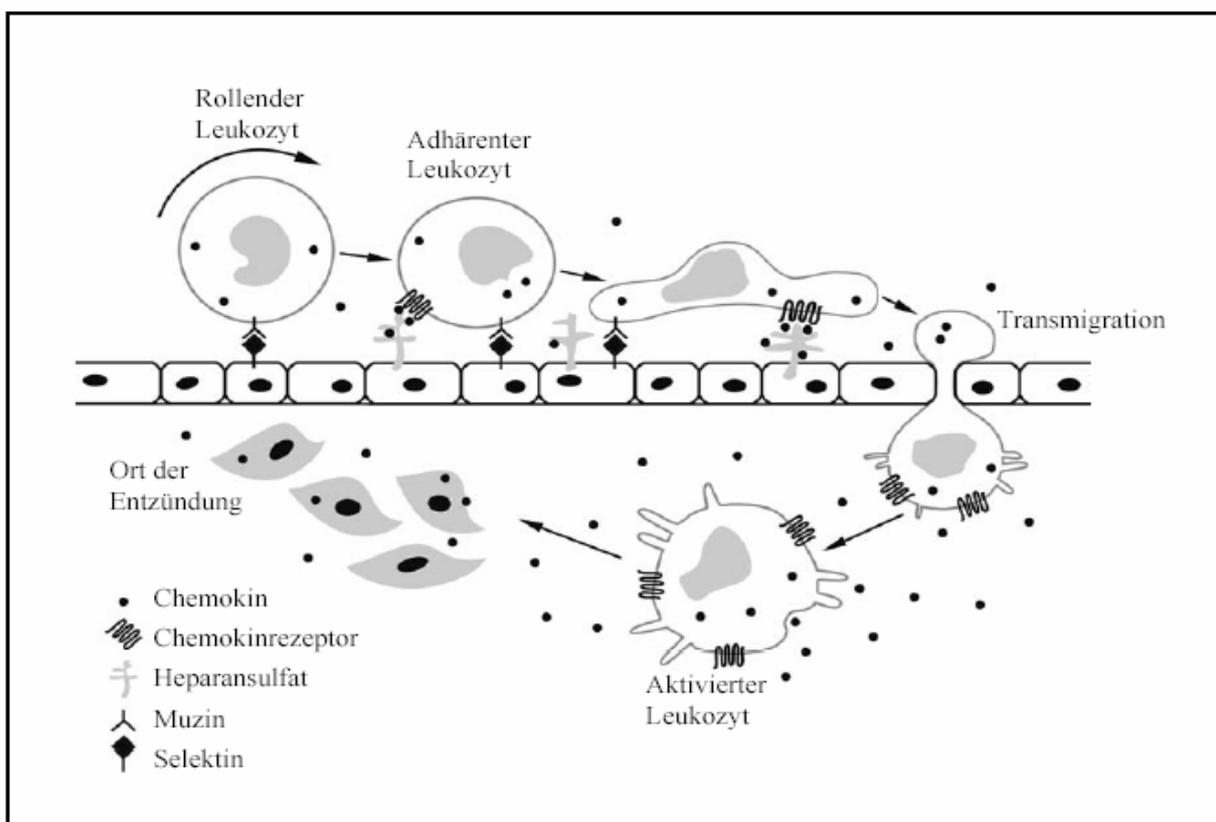


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Rekrutierung von Leukozyten. Chemokine bewirken die Adhäsion der Leukozyten an Endothelzellen. Nach der Extravasation folgen sie einem von Chemokinen gebildeten Konzentrationsgradienten zum Ort der Entzündung (Abbildung nach Vorlage aus Ref. ⁸⁹).

Durch sie werden im Bereich der Entzündung und Infektion ansässige Gewebezellen gebunden, Leukozyten rekrutiert, zytokin-aktivierte Endothelzellen sezerniert und bilden zudem einen Chemokingradienten ⁸⁹. Diesen Gradienten folgend, laufen die Leukozyten an der Endothelzellmembran entlang, was auch als Haptotaxis bezeichnet wird ¹²⁴. Dies aktiviert chemotaktisch wirkende Proteine des Komplementsystems C5a und kann in diesem Prozess die vermehrte endotheliale

Expression von P-Selektinen induzieren. Zusätzlich sind auf den Leukozyten Integrine erhöht^{65,150}, was zu einer festen Bindung führt und damit die Grundlage für deren Extravasation schafft. Durch Chemokine gesteigerte und aktivierte Matrix-Metalloproteinasen sorgen für ein Lyse der Basalmembran⁸¹, ein Vorgang, der wiederum die Transmigration der Leukozyten erleichtert^{69,160}.

In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es bei Patienten mit CED zu einer erhöhten Expression verschiedenster Chemokin-Rezeptoren kommt, darunter auch CCR6⁹⁶ (Tabelle 4). Weitere sind die Chemokin-Rezeptoren CXCR1 und CXCR2, die sowohl in der Mukosa bei aktivem M.Crohn, als auch bei aktiver Colitis ulcerosa gesteigert sind^{26,77,91,94}. Der Spiegel ihres Liganden IL-8 korreliert dabei mit der Stärke der Entzündung⁹².

Chemokin	normale Mukosa	Expression bei CED	Chemokin-Rezeptor	Studien
IL-8	+	+++	CXCR1,2	70,76,81,85
Eotaxin	+	+++	CCR3	85
ENA 78	-/+	++	CXCR2	88
MCP-1	+	++	CCR2	89,91,92,93
MCP-3	+	++	CCR1,2,3	91, 94
RANTES	+	++	CCR1,3,5	53
MIP-1 α	-	++	CCR1,5	53
MIP-3 β	-	++	CCR5	53
IP-10	+	++	CXCR3	53,85
Fractalkine	+	++	CX3CR1	68
TECK	+	++	CCR9	97
MEC	+	+	CCR10	51,106
CCL20	+	++	CCR6	25
SDF-1	+	?	CXCR4	107

Tabelle 4: Chemokin-Expression in normaler und entzündeter intestinaler Mukosa, nach Papadakis¹⁰⁹ (modifiziert).

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass Chemokine und deren Rezeptoren eine zentrale Rolle bei mukosaler Entzündung und bei der Rekrutierung von Effektorzellen, wie sie bei CED zu finden ist, spielen. Das Profil der Zytokine/Chemokine ist somit wichtig für die Entwicklung von chronischen Krankheiten.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Chemokin-Rezeptor CCR6 bei der Migration von DC als Antwort auf CCL20 in die Domregionen der Peyer`schen Plaques involviert ist. Ein Mechanismus, der verbunden ist mit der Regulation von Antigen-Erkennung im Intestinum⁶⁶. Im Gegensatz zu den DC in den Peyer`schen Plaques fehlt den Lamina propria CX3CR1⁺ DC die CCR6-Expression, was darauf schließen lässt, dass die Akquisition von luminalem Antigen durch die Lamina propria

CX3CR1⁺ DC ein alternatives und unabhängiges System darstellt, das mit dem M-Zell-abhängigen Peyer'schen Plaque System koexistiert ¹⁰⁴. Aufgrund der Invasion von Follikel assoziierten Epithel durch ein enterisches Pathogen werden CCR6⁺ DC in die Peyer'schen Plaques angeworben und sind somit für die schnelle lokale Aktivierung der Pathogen-spezifischen T-Zellen verantwortlich ¹²⁶. In Abbildung 14 sind die DC in den intestinalen Antigen-Aufnahme-Signalwegen dargestellt.

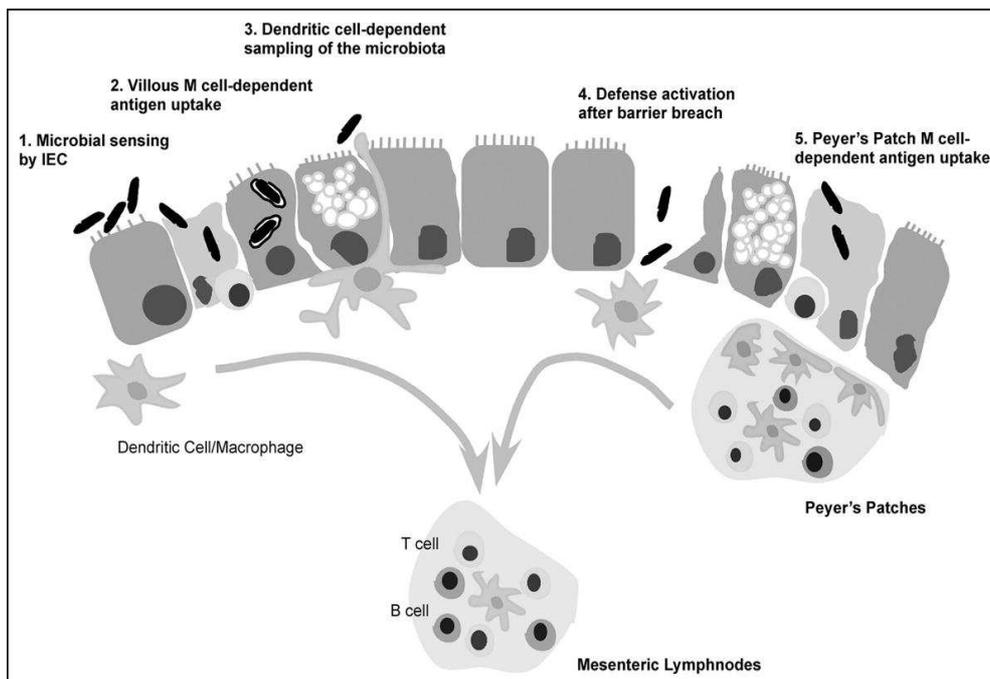


Abbildung 14: Schematische Darstellung der intestinalen Antigen-Aufnahme-Signalwege. DC phagozytieren Antigene durch intestinale Epithelzellen und zottige M-Zellen. Die Mikroflora und Pathogene werden von den DC und den Makrophagen phagozytiert, nachdem sie die Lamina propria durch eine intestinale Barriere-lücke durchwandert haben. M-Zellen, die in dem Follikel assoziierten Epithel lokalisiert sind, liefern die Antigene an die DC in den subepithelialen Domregion der Peyer'schen Plaques aus (Originalabbildung aus Ref. ¹⁰⁴).

1.5 Ziel dieser Arbeit

Das Hauptziel der vorgelegten Arbeit war die Charakterisierung des CCL20/CCR6-Chemokin-Ligand-Rezeptor-Systems in intestinalen Epithelzellen (IEC), insbesondere bei intestinaler Entzündung, da es zum Zeitpunkt des Beginns der Dissertationsarbeit keine Untersuchungen dazu gab.

1. Grundlegende Fragestellung als Voraussetzung für alle weiteren Untersuchungen war die der Expression von CCR6 und seinem Liganden CCL20 in IEC und kolorektalen Zellen. Zu diesem Zweck sollen mit Hilfe von semiquantitativen PCRs die mRNA-Expression von CCR6 und CCL20 in humanen IEC-Zelllinien nachgewiesen werden. Der Nachweis der Expression von CCR6 in DC wurde bereits in früheren Untersuchungen erbracht^{104,126}. Interessanterweise führt CCL20 zu einer Chemoattraktion von unreifen DC bei intestinaler Entzündung oder Antigen-Stimulation¹⁹.
2. Zweiter Schritt bei der Analyse des CCL20/CCR6-Systems ist die Analyse der Signaltransduktion. Zur Klärung dieses Untersuchungspunktes sollen in mehreren Western-Blot-Analysen mit Hilfe von Inhibitionsexperimenten die Aktivierungen der MAP-Kinasen durch CCL20 untersucht werden. In Frage kommende Kinasen sind Akt und die MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK-1/2 und p38, für die auch eine Aktivierung durch andere Chemokinsysteme gezeigt werden konnte.
3. Als letzter Schwerpunkt wurden Untersuchungen zu biologischen Funktionen des CCL20/CCR6-Systems durchgeführt. Dazu gehören neben der Frage der Entzündungspathogenese auch die Einflüsse dieses Chemokin-Systems auf die Proliferation und Apoptose, insbesondere da bereits in früheren Studien eine gesteigerte Zellproliferation und eine verminderte Apoptose in kanzerogenem Gewebe gezeigt werden konnte. Ein weiterer wichtiger biologischer Effekt ist der Mechanismus der Wundheilung nach Verletzung der IEC-Barriere. Aus diesem Grund ist es notwendig, den Einfluss der CCR6-Aktivierung auf die Zellmigration zu klären.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und biochemische Reagenzien

Aceton	Merck (Darmstadt)
3-Amino-9-Ethyl-Carbazol-Substrat	Zytomed (Berlin)
[$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP	Perkin Elmer
Avidin-Biotin-Blocking-Kit	Vector (Burlingame, CA, USA)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Betain	Roche (Mannheim)
Bradford-Reagenz	Bio-Rad (München)
35-Brij-Lösung	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Bio-Rad (München)
BSA	Merck (Darmstadt)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Commassie Brilliant Blue R-250	Merck (Darmstadt)
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
EDTA	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
EGTA	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Eisessig	Merck (Darmstadt)
Endotoxin freies Wasser	Life Technologies (Rockville, MD, USA)
Entwicklungspuffer	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol, absolut (p.A.)	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Formaldehyd (37%)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Gelatine (bovine)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Geneticin (G418-Sulfat)	GIBCO (BRL/Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)
Glyzerin	Merck (Darmstadt)
Hämatoxylin	Merck (Darmstadt)
HEPES	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
HCl	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaiser's Glycerol Gelatine	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Label	Biogenex (San Ramon, USA)
LB-Agar	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Lipopolysaccharide von E.coli (O26:B6)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Magermilchpulver	Bio-Rad (München)
MEK-1-Inhibitor PD98059	Tocris Cookson (Bristol, UK)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Protease	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Proteinstandard (Magic Mark)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Proteinstandard (Multi-Colored, „Multi Mark“)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Mowiol	Merck (Darmstadt)
NaCl-Lösung (5 M, RNase-frei)	Ambion (Austin, TX, USA)
Natrium-(di)-hydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)

Natriumfluorid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Nonidet-P40	Roche (Mannheim)
NuPAGE LDS-Probenpuffer (4 x)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NuPAGE MOPS-Laufpuffer (20 x)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NuPAGE Reduzierungsagens (10 x)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
p38-Inhibitor SB203580	Tocris Cookson (Bristol, UK)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
PI3-Kinase Inhibitor Wortmannin	Tocris Cookson (Bristol, UK)
Peroxidase-Blockierungsreagenz	DAKO (Hamburg)
PMSF	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Pro Taqs I Antigen Enhancer	Quartett (Berlin)
RNA Millennium Marker	Ambion (Austin, TX, USA)
RNA-Ladepuffer mit Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
R-Phycoerythrin Streptavidin Konjugat	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)
SAPK/JNK-Inhibitor SP600125	Tocris Cookson (Bristol, UK)
SDS-Lösung (20%)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
SSPE (20 x)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Sukrose	Merck (Darmstadt)
Superscript II (reverse Transkriptase)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Tris	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Triton-X-100	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Trizol	GIBCO (BRL/Life Technologies, Gaithersburg, MD)
Tween-20 (10%)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Wasserstoffperoxid	Merck (Darmstadt)

2.1.2 Kits und Reaktionssysteme

BD OptEIA Human IL-8 ELISA Kit II	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Cell Titer 96 AQueous Non-Radioactive Cell	Promega (Madison, WI, USA)
Complete protease-inhibitor-Mix	Roche (Mannheim)
ECL Western-Blotting Detection Reagents	Amersham (Arlington Heights, IL)
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche (Mannheim)
Quantitect SYBR Green PCR Kit	Qiagen (Hilden)
Vectastain ABC Elite system	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Cronex 5 Medical Röntgenfilme	Agfa-Gevaert (Mortsel, Belgien)
Glaspipetten	BD-Biosciences (San Jose, CA, USA)
Wellplatten für Zellkultur	BD-Biosciences (San Jose, CA, USA)
Nitrozellulosemembran (0,45 µm Porengröße)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NuPAGE Bis-Tris-Gele	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Objektträger	Menzel-Gläser (Braunschweig)
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml (RNase-frei)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen Marke Safeseal-Tips	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Reaktionsgefäße (RNase-frei, 1,5 ml)	Ambion (Austin, TX, USA)
Zellkulturschalen	BD-Biosciences (San Jose, CA, USA)
Zellschaber	BD-Biosciences (San Jose, CA, USA)

2.1.4 Rekombinante Proteine

- Rekombinante Proteine generiert in Maus gegen humanes CCL20, TNF- α und IL-1 β (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

2.1.5 Antikörper

Polyklonale Antikörper	Herkunftsorganismus	Hersteller/Quelle
Phospho-ERK-1/2 (Thr183/Tyr185)	Kaninchen	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
Phospho-SAPK/JNK-1/2 (Thr183/Tyr185)	Kaninchen	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
Phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	Kaninchen	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
Phospho-Akt (Ser473)	Kaninchen	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
Anti-ERK-1/2	Kaninchen	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
Anti-SAPK/JNK-1/2	Kaninchen	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
Anti-p38	Kaninchen	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
Anti-Akt	Kaninchen	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)

Tabelle 5: Für die Western-Blots verwendete Antikörper

- Monoklonaler Antikörper generiert in Maus gegen humanes CCR6 (Klon 53103, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).
- Monoklonaler Antikörper generiert in Maus gegen humanes CCL20 (Klon 67310, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).
- Monoklonaler zu CCL20 und CCR6 isotypenübereinstimmender Maus IgG2b Antikörper (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).
- Sekundärer Anti-Kaninchen Antikörper generiert in Esel (HRP-konjugiert, Amersham, Arlington Heights, IL).

2.1.6 Oligonukleotide

Gen	erwartete Produktgröße	Sequenz	Annealing-Temperatur
CCR6	1021 bp	vorwärts: 5'- ATT TCA GCG ATG TTT TCG ACT C -3' rückwärts: 5'- GGA GAA GCC TGA GGA CTT GTA -3'	61°C
CCL20	323 bp	vorwärts: 5'- TTG CTC CTG GCT GCT TTG ATG -3' rückwärts: 5'- TCT TTC TGT TCT TGG CGT ATG -3'	58°C
GAPDH	982 bp	vorwärts: 5'- CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC -3' rückwärts: 5'- TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT -3'	61°C

Tabelle 6: Für die semi-quantitative PCR verwendete Primer

Gen	erwartete Produktgröße	Sequenz	Annealing-Temperatur
CCL20	225 bp	vorwärts: 5'- CTA CTC CAC CTC TGC GGC GAA -3' rückwärts: 5'- TTT TAC TGA GGA GAC GCA CAA -3'	61°C
Beta-actin	119 bp	vorwärts: 5'- GCC AAC CGC GAG AAG ATG A -3' rückwärts: 5'- CAT CAC GAT GCC AGT GGT A -3'	58°C
IL-8	91 bp	vorwärts: 5'- CCA GGA AGA AAC CAC CGG A -3' rückwärts: 5'- GAA ATC AGG AAG GCT GCC AAG -3'	61°C

Tabelle 7: Für die quantitative PCR verwendete Primer

2.1.7 Zelllinien

2.1.7.1 Säugerzelllinien

Die humanen CRC-Zelllinien T84, SW480, Caco-2, HT-29, HCT116 und DLD-1 stammten von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA).

Zelllinie	Charakterisierung	Grundmedium	Zusätze
HT-29	Humane kolorektale Adenokarzinomzellen adhärent	DMEM	10% FCS 1% PS
SW480	Humane kolorektale Adenokarzinomzellen adhärent	DMEM	10% FCS 1% PS
HCT116	Humane kolorektale Karzinomzellen adhärent	DMEM	10% FCS 1% PS
Caco-2	Humane kolorektale Adenokarzinomzellen adhärent	DMEM	10% FCS 1% PS
T84	Metastatische Zellen eines Kolonkarzinoms isoliert aus einer Lungenmetastase adhärent	DMEM/F12	10% FCS 1% PS
DLD-1	Humane kolorektale Adenokarzinomzellen adhärent	DMEM	10% FCS 1% PS

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Kolonkarzinomzelllinien

2.1.7.2 Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 1000 mg/l Glucose, L-Glutamin und Pyruvat)	GIBCO (BRL/Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)
DMEM/F12 (1:1) (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12 Medium mit L-Glutamin und 15 mM HEPES)	GIBCO (BRL/Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)
DMSO-Lösung (20%)	Merck (Darmstadt)
Dulbecco's PBS+CaCl ₂ +MgCl ₂	GIBCO (BRL/Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)
FCS Gold	PAA (Pasching, Österreich)
Gelatine (0,1 % in H ₂ O, autoklaviert)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Insulin (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
100 x PS (10000 U/ml Penicillin; 10000 µg/ml Streptomycin)	GIBCO (BRL/Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)
Trypanblau	Merck (Darmstadt)
Trypsin-EDTA	GIBCO (BRL/Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung permanenter Zelllinien

Für die Zellkultur wurde als Brutschrank ein Sterikult-Inkubator verwendet, der Raumluft bei 37°C auf 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit anreicherte. In flüssigem Stickstoff gelagerte oder bei -80°C eingefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert und anschließend in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Der Zustand der Zellen wurde mikroskopisch überprüft. Während die T84-Zellen in Dulbecco`s modifizierten Eagle Medium/F-12 (GIBCO BRL/Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) wuchsen, wurden die anderen Zelllinien in Dulbecco`s modifizierten Eagle Medium (GIBCO) mit 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10% Hitze-inaktivierten/fetalem Kalbserum (PAA, Pasching, Austria) gehalten. Für die Passagierung und „Ernte“ wurde der Zellrasen einmal mit vorgewärmten PBS gewaschen, durch Inkubation mit 0,05% Trypsin-/0,02% EDTA-Lösung vom Petrischalenboden abgelöst und die Reaktion anschließend durch den Zusatz von Medium mit 10% fetalem Kälberserum gestoppt. Nach einer Zentrifugation von 1200 rpm für 10 min wurde das Zellsediment im Kulturmedium aufgenommen und die Zellen wieder in gewünschter Dichte ausgesät oder für andere Analysen verwendet. Zum Einfrieren wurden die Zellen gezählt, anschließend für 5 min bei 1200 rpm pelletiert und in kaltem Gefriermedium (80% FCS, 20% DMSO) resuspendiert, so dass eine Zelldichte von 3-5 x 10⁶/ml erreicht wurde. Davon wurde je 1 ml in ein Gefrierröhrchen gegeben und dieses sofort auf Eis gestellt. Die Proben wurden bei -80°C heruntergekühlt und anschließend bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.1.2 Bestimmungen der Zellzahl

50 µl der erhaltenen Zellsuspensionen wurden mit 50 µl Trypanblau vermischt. Nach kurzer Einwirkzeit haben sich tote Zellen komplett blau gefärbt, während lebende Zellen den sauren Farbstoff nicht aufnehmen können. Die Zellsuspension wurde in eine Neubauer Zählkammer zwischen Kammer und Deckglas gegeben und die lebenden Zellen, die sich in den vier Großquadraten der Kammer befanden, unter dem Mikroskop gezählt. Die Zellzahl konnte dann durch folgende Gleichung errechnet werden.

Zellzahl/ml = Mittelwert gezählter Zellen in den vier Großquadraten x 2 x 10⁴

- Der Faktor 2 entspricht der Verdünnung mit Trypanblau.
- Der Faktor 104 bezieht sich auf die Umrechnung von 0,1 µl Volumen eines Großquadrates auf ein Volumen von 1 ml.

2.2.1.3 Zellstimulation

Die Zellen wurden für 12-16 h in serum-freiem Medium bzw. Medium mit 0,1 oder 1% FCS inkubiert. Je nach Versuch wurden die Zellen für 1 h mit entsprechenden Inhibitoren präinkubiert, bevor die Stimulation mit dem Chemokin erfolgte.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Methoden zur RNA-Analyse

2.2.2.1.1 RNA-Isolierung aus humanen Zelllinien

Die RNA-Isolierung erfolgte aus Zellen in einer 6 cm Kulturschale mit Hilfe von Trizol (GIBCO BRL/Life Technologies, Gaithersburg, MD). Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, anschließend mit 1 ml Trizol von der Platte geschabt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden sie 6-mal durch eine 21G-Nadel gesaugt. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden 200 µl Chloroform zugegeben und die Reaktionsgefäße für 20 s geschüttelt. Nach einigen Minuten wurden die Lysate mit 12000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die entstandene klare obere Phase, welche die RNA enthielt, wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500 µl Isopropanol zugegeben, die Gefäße durch Schwenken gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation mit 12000 g für 1 min bei 4°C, um die gefällte RNA zu pellettieren. Das Pellet wurde 2-mal mit je 1 ml 70% EtOH gewaschen. Dazwischen erfolgte jeweils ein Zentrifugationsschritt (7500 g, 5 min, 4°C). Am Ende wurde die RNA kurz getrocknet, in Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.2.1.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration in einer Lösung erfolgte mittels Messung der Absorption bei 260 nm Wellenlänge. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Wert von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Als Maß für die Reinheit der RNA diente der Quotient aus den optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Für reine RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte bedeuten

Verunreinigungen mit Proteinen, höhere Werte zeigen Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern an. Die Messungen erfolgten in einem UV-Spektralphotometer.

2.2.2.1.3 DNase-Behandlung der RNA-Isolierungen

Die RNA-Lösung wurde mit einem entsprechenden Volumen an 10 x DNase-Puffer versetzt und es wurden 2,5 IU DNase zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurden weitere 2,5 IU hinzugegeben und noch einmal wie oben inkubiert. Anschließend wurden 0,2 Volumen DNase-Inaktivierungsreagenz addiert und gut durchmischt. Nach kurzer Inkubation wurden die Proben mit 10000 g für 1,5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.2.2 Methoden zur DNA-Analyse

2.2.2.2.1 Erststrang-cDNA-Synthese (RT-PCR)

Für die RT-PCR wurde die RNA, wie unter 2.2.3 beschrieben, mit Ribonuklease (RNase)-freier Deoxyribonuclease (DNA-free TM-Kit, Ambion) behandelt, um potenzielle genomische DNA-Kontaminationen zu entfernen. Die reverse Transkription der RNA erfolgte durch den first strand cDNA-Synthese-Kit von Roche. Dazu wurde ein Ansatz mit 2 µg RNA und 1 µl Random-Primer mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt und für 5 min im PCR-Cycler bei 70°C inkubiert. Dann gab man auf Eis 2 µl 10 x Reaktionspuffer, 2 µl von 10 µM Oligo-p(dT)₁₅, 10 Einheiten/µl RNase-Inhibitor und je 0,5 mM dNTP dazu und temperierte für zwei Minuten auf 42°C. Nach Zugabe von 4 Einheiten reverse Transkriptase wurde die reverse Transkription in 20 µl Gesamtvolumen für 1 h bei 37°C durchgeführt.

Zur Kontrolle für die genomische Kontamination, wurde eine identische PCR mit Startmaterial, das zuvor nicht reverse transkribiert wurde, parallel durchgeführt.

2.2.2.2.2 Polymerase-Ketten- Reaktion (PCR)

Ein typischer Reaktionsansatz für die Polymerase-Ketten-Reaktion sah folgendermaßen aus: 2 µl cDNA, 5 µl 10 x Reaktionspuffer, 2,5 µl von 50 mM MgCl₂, je 0,4 µM Primer und 0,4 mM dNTP. Nach Hinzufügen von 2,5 U/µl Taq-Polymerase wurde die semi-quantitative PCR in einem Gesamtvolumen von 50 µl bei folgenden Bedingungen durchgeführt: 25 oder 35 Zyklen (abhängig von der spezifischen PCR) für die Denaturierung bei 95°C für 45 s, das Annealing fand bei 61°C für 45 s und die Extension bei 72°C für 45 s statt. Alle PCR-Reaktionen beinhalteten GAPDH-Primer

zur Quantifizierung der PCR-Produkte. Für die PCR-Reaktionen wurden spezifische Primer mit den folgenden Sequenzen verwendet: für CCR6 vorwärts und rückwärts 5'-ATTCAGCGATGTTTTCGACTC-3' und 5'-GGAGAAGCCTGAGGACTTGTA-3', CCL20 vorwärts und rückwärts 5'-TTGCTCCTGGCTGCTTTGATG-3' und 5'-TCTTTCTGTTCTTGGCGTATG-3', GAPDH vorwärts und rückwärts 5'-CATGTGGCCATGAGGTCCAC-3' und 5'-TGAAGGTCGGAAGTCAACTGAT-3'. Die PCR-Produkte wurden in pCR 2.1 Vektor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) subkloniert und sequenziert.

2.2.2.2.3 Quantitative PCR nach Stimulation mit LPS, TNF- α , IL-1 β und CCL20

Für die Real-Time-PCR wurde der QuantiTect SYBR Green PCR-Kit von Qiagen eingesetzt, welcher neben dem PCR-Puffer auch bereits dNTPs, SYBR Green und eine Hotstart-DNA-Polymerase enthält. Ein typischer Reaktionsansatz sah folgendermaßen aus: 8 μ l cDNA bei einer 1:20-Verdünnung, 10 μ l eines 2 x Quantitect PCR-Mixes und je 0,3 μ M Primer. Verwendet wurden dabei folgende Primer-Paare: für CCL20 vorwärts 5'-CTACTCCACCTCTGCGGCGAA-3' und rückwärts 5'-TTTTACTGAGGAGACGCACAA-3', für beta-Aktin vorwärts 5'-GCCAACCGCGAGAAGATGA-3' und rückwärts 5'-CATCACGATGCCAGTGGTA-3' und für IL-8 vorwärts 5'-CCAGGAAGAAACCACCGGA-3' und rückwärts 5'-GAAATCAGGAAGGCTGCCAAG-3' (MWG-Biotech, Ebersberg). Bei einem Gesamtvolumen von 20 μ l erfolgte für die PCR-Reaktion zunächst eine 15-minütige Denaturierung bei 94°C zur Aktivierung der HotStart-Polymerase, anschließend wurde eine PCR mit 40 Zyklen durchgeführt: 30 s Denaturierung bei 94°C, 30 s Annealing bei entsprechender Temperatur und 30 s Elongation bei 72°C. Die PCRs wurden in einem Rotorgene-3000-Gerät (Corbett Research, Sydney, Australien) durchgeführt und analysiert. Die Expression von beta-Aktin wurde zur Normalisierung der CCL20-mRNA-Expression verwendet. Um die Spiegel der CCL20-Expression zwischen entzündlichen und nicht-entzündlichen Kolonläsionen zu vergleichen, wurde die CCL20-Expression in nicht-entzündlichen Geweben auf 1,0 normalisiert.

2.2.2.2.4 Sequenzierung

Die PCR-Produktgröße und PCR-Quantität wurde durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Fragmente wurden mit dem QIAquick PCR-Reinigungs-Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt und mit dem ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit sequenziert (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die Sequenzen wurden auf dem ABI PRISM 377 DNA-Sequenzer (Applied Biosystems) analysiert, wobei das Sequenz-Analyse-Programm der Version 3.4.5 (Applied Biosystems) verwendet wurde.

2.2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.2.3.1 Zellstimulation mit CCL20 zur Analyse von ERK-1/2-, SAPK/JNK-1/2-, p38- und Akt-Phosphorylierung

Für die Experimente wurden die Zellen in 6 cm Kulturschalen ausgesät. Eine Konfluenz von 70-80% der Zellen war Voraussetzung für die Stimulation. 13 h vor Versuchsbeginn wurden die Zellen auf serum-freies Medium gesetzt. Die Stimulation erfolgte mit CCL20 (100 ng/ml) in einem Zeitintervall von 0 - 60 min. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, und die Kulturschalen 3-mal mit kaltem PBS gewaschen. Um weitere unbeabsichtigte Aktivierungen zu vermeiden, wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und daraufhin bei -80°C bis zur weiteren Behandlung gelagert.

2.2.2.3.2 Inhibitionsexperimente mit PD98059, SP600125, SB203580 und Wortmannin

Für die Inhibitionsexperimente wurde dasselbe Verfahren angewendet wie unter 2.2.2.3.1 beschrieben. Allerdings wurden die Zellen zusätzlich, nachdem sie für 13 h auf serum-freiem Medium gesetzt worden sind, mit dem jeweiligen Inhibitor für 1 h im Inkubator inkubiert (PD98059 10 µM für ERK-1/2, SP600125 20 µM für SAPK/JNK, SB203580 20 µM für p38, Wortmannin 25 µM für Akt). Erst danach erfolgte die Stimulation mit CCL20. Als Zeitintervalle wurden für die Positiv-Kontrolle, wie auch für den Inhibitor jeweils 0, 15 und 30 min gewählt.

2.2.2.3.3 Gesamtproteinextraktion aus stimulierten Zellen

Auf Eis gelagert wurden die schockgefrorenen Zellen mit Hilfe von Zellschabern und 200 µl Lysispuffer und 1 µl einer 1 mM PMSF-Lösung aufgenommen und 6-mal

durch eine 21G-Nadel gesaugt. Nach einer 20 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 10000 g für 20 min bei 4°C. Der Überstand, welcher die Proteine enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aus diesem Überstand konnte nun die Proteinkonzentration bestimmt werden.

-Lysispuffer: 20 mM Tris-HCl von pH 7,4, 1% Nonidet-P40, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 2 mM PMSF, 400 mM NaVO₃, 4 mM NaF, Proteaseinhibitormix, H₂O_{bidest}

2.2.2.3.4 Quantifizierung von Proteinen

Die Proteinkonzentration in einer Lösung wurde mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt. Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass der in der Lösung enthaltene Farbstoff (Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG)) verschiedene Absorptionsmaxima zeigt, je nachdem ob er an Protein gebunden ist oder nicht. Die nicht gebundene kationische Form von CBBG zeigt ein Absorptionsmaximum bei 470 nm, während sich dieses bei der proteingebundenen anionischen Form bei 595 nm befindet. Mit Hilfe einer Standardkurve, welche mit bekannten Proteinkonzentrationen erstellt wurde, konnte so die Proteinkonzentration einer unbekannt Probe spektrophotometrisch bestimmt werden. Für die Standardkurve wurden verschiedene Verdünnungen von BSA hergestellt (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10 mg/ml). Die Bradfordlösung wurde 1:5 mit Wasser verdünnt und 1 ml davon mit 2 µl Proteinlösung vermischt, kurz inkubiert und dann im Spektrophotometer bei 595 nm gemessen.

2.2.2.3.5 Auftrennung von Proteinen mit SDS-PAGE

Proteingemische wurden zunächst mit einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Hierzu wurden 4 - 12%ige vorgefertigte 8 cm x 8 cm NuPAGE Bis-Tris-Gele (pH 6,4) der Firma Invitrogen und ein reduzierender 1 x MOPS/SDS-Laufpuffer verwendet. Als Größenmarker dienten entweder der Magic Mark oder der Multi Mark Proteinstandard von Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Proteinlösungen mit 10 - 80 µg Proteingehalt vermischte man mit ¼ Volumen LDS-Probenpuffer und 1/10 Volumen 0,5 M DTT in 22 µl Gesamtvolumen. Dann wurde die Probe für 10 min bei 70°C denaturiert, das Gel beladen und in einer vertikalen Gel-Apparatur bei 130 V für 90 min elektrophoretisiert.

-1 x Laufpuffer 1 (äußere Kammer):	50 mM Tris-Base, 3,4 mM SDS, 1 mM EDTA
-1 x reduzierender Laufpuffer 2 (innere Kammer):	200 ml 1 x Laufpuffer 1 + 500 µl Nu PAGE Antioxidantien
-LDS-Probenpuffer:	4 g Glycerol, 0,682 g Tris-Base, 0,666 g Tris-HCl, 0,8 g LDS, 0,006 g EDTA, 0,75 ml 1%iger Lösung an Serva Blue G250, 0,75 ml 1%iger Lösung an Phenolrot, auf 10 ml mit Wasser auffüllen

2.2.2.3.6 Western-Blot-Analyse

2.2.2.3.6.1 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)

Der Transfer der aufgetrennten Proteinproben aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore), die zuvor für 1 min in Methanol eingeweicht wurde, erfolgte nach der „Semidry-Blotting“-Methode¹⁶. Hierzu wurde an ein mit Transferpuffer getränktes Gel-Membran-Blottingpapier-Sandwich für 2 h eine Spannung von 25 - 30 V angelegt. Der Transfer erfolgte in einer Invitrogen-Apparatur.

-Transferpuffer: 39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,04% SDS, 20% Methanol (v/v)

2.2.2.3.6.2 Immundetektion von immobilisierten Proteinen

Wenn nicht gesondert aufgeführt, wurden alle Schritte bei RT unter ständigem leichtem Schütteln durchgeführt.

Die Membran wurde nach dem Transfer für 1 h bei RT mit 10 ml Blockierlösung vorbehandelt, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Danach wurde die Membran 3-mal 5 min in TBS-Puffer gewaschen und anschließend mit dem primären Antikörper (verdünnt in 5%igen BSA in TBS-T) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer wurde mit dem sekundären Antikörper (verdünnt 1:2000 bzw. 1:5000 in Blockierpuffer) für 1 h bei RT inkubiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers. Die Banden wurden durch Autoradiographie mit einem BioMax MR-Film (Kodak) visualisiert.

-1 x TBS-Puffer (pH 7,5):	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl
-1 x TBST-Puffer:	1 x TBS-Puffer + 0,05% (v/v) Tween-20
-Blockierlösung:	5% fettfreies Milchpulver in TBS-Puffer
-Waschpuffer:	0,5% fettfreies Milchpulver in TBST-Puffer

2.2.2.3.6.3 „Strippen“ von Immunoblots

Die Membranen wurden kurz in TBS-T gewaschen und dann für 30 min bei 50°C unter Schwenken in Stripping-Puffer inkubiert, um gebundenen Antikörper zu entfernen. Nach einem erneuten Blockierungsschritt in 5%iger Milch wurden die Membranen wie oben beschrieben mit einem neuen Antikörper inkubiert und entsprechend weiterbehandelt.

-Stripping-Puffer: 83 mM Tris-HCl von pH 7,5, 2% SDS, 0,7% β -Mercaptoethanol (v/v), in H_2O_{bidest}

2.2.2.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die Quantifizierung der IL-8-Freisetzung wurde der BD OptEIA Human IL-8 ELISA Kit II (BD Biosciences, Bedford, MA) verwendet. Dazu wurden Zellen in 6 cm Zellkulturplatten bis zu einer Dichte von 70% herangezüchtet. Nach serum-freier Kultivierung für 12 h wurden 100 μ l Medium entnommen (Nullwert). Anschließend erfolgte eine Stimulation der Zellen mit CCL20 oder LPS. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden jeweils 100 μ l Medium entnommen und bei -20°C bis zur Messung eingefroren. Für die Messung der IL-8-Konzentration wurde eine Verdünnungsreihe von IL-8 hergestellt, welche parallel zu den Proben gemessen wurde. Es wurden zunächst in eine 96-well-Platte, welche mit immobilisiertem IL-8 Antikörper beschichtet war, je 50 μ l ELISA-Verdünnungslösung pro well gegeben und diese dann mit 100 μ l Probe bzw. Standard vermischt. Es erfolgte eine Inkubation für 2 h bei RT. Während dieser Zeit wurde das im Medium befindliche IL-8 von den Antikörpern gebunden. Anschließend wurde 5-mal mit je 300 μ l Waschpuffer pro well gewaschen. Nach Zugabe von 100 μ l fertig gemischter Detektierlösung (welche einen biotinylierten IL-8-Antikörper und ein Avidin-HRP-Konjugat enthielt) wurden die Ansätze für 1h bei RT inkubiert. Nach sieben Waschschritten wie oben beschrieben, wurden 100 μ l TMB-Lösung hinzugegeben, und die Platten für 30 min im Dunklen inkubiert. Nach Zugabe von 50 μ l 1 M Phosphorsäure wurde die Absorption der Proben bei 450 nm gemessen. Anhand der vorher hergestellten IL-8-Verdünnungsreihe konnte eine Standardkurve erstellt werden und aus dieser die IL-8-Konzentrationen der Proben berechnet werden.

-Renaturierungspuffer: 2,5% Triton X-100 in H_2O_{bidest}

2.2.3 Immunhistochemischer Nachweis von humanem CCR6 und CCL20 in Gewebekulturen

Die Gewebebiopsien stammten von Patienten mit CRC, bei denen eine Kolektomie oder eine Lymphknotenresektion durchgeführt wurde. Das Material wurde von Patienten entnommen, die zuvor über die Verwendung der Biopsien aufgeklärt und schriftlich ihr Einverständnis gegeben hatten.

Die immunhistochemischen Analysen wurden an 3 µm dicken Schnitten gemäß den Standardprozeduren untersucht. Nach der Behandlung mit Pro Taqs I Antigen Enhancer (Quartett, Berlin) wurden die Schnitte für 2-mal 5 min in TRIS-Puffer gebadet. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde zunächst durch die 10-minütige Inkubation mit 7,5%igem H₂O₂, gefolgt von 10 min in Wasser, geblockt. Anschließend wurden die Schnitte wieder für 2-mal 5 min in TRIS-Puffer getaucht. Die primären humanen Antikörper CCL20 und CCR6 wurden mit Hilfe des Vectastain ABC Elite system (Vector Laboratories, Burlingame, USA) visualisiert. In Negativ-Kontrollen wurden die Schnitte mit einem isotypenübereinstimmenden Maus IgG2b Antikörper gefärbt. Nach kurzer Inkubation mit 0,05%igem TRIS-Puffer in einer 35-Brij-Lösung wurden die Schnitte für 15 min in das 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol-Substrat (Zytomed, Berlin) getaucht und anschließend leicht mit Hämatoxylin gefärbt. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Kaiser`s Glycerol Gelatine fixiert.

-TRIS-Puffer: 0,05 mol/l Tris/HCl saline, pH 7,5 einstellen

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Zellproliferationsassay

HT-29 Zellen wurden auf eine 96-well-Platte mit einer Dichte von 10.000 Zellen pro well ausgesät. Nach 6 Stunden wurden die Zellen auf ein serum-freies Medium gesetzt und nach weiteren 12 - 16 h erfolgte die Stimulation mit 10 ng/ml, 100 ng/ml oder 1000 ng/ml CCL20 bei 37°C und 5% CO₂ oder mit CCL20-freiem Medium als Negativ-Kontrolle. Nach 48 h wurde die Zellproliferationsrate durch den MTS-Assay unter Verwendung des CellTiter 96[®] Aqueous Non Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI) ermittelt. Dazu wurden in jedes well 20 µl einer kombinierten MTS/PMS Lösung im Verhältnis von 1:20 pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 490 nm in einem ELISA-Platten-Lesegerät mit dem Programm Magellan Version 3.11 (Fa. Tecan, Crailsheim).

-PMS: 0,92 mg/ml in PBS
-MTS: 2 mg/ml in PBS

2.2.4.2 Wounding-Assay

SW480-Zellen, die in Pilotexperimenten die am besten geeignete CRC-Zelllinie für diese Experimentreihe waren, wurden in 6-well-Platten bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Mit Hilfe einer Rasierklinge wurden pro Platte 6 Epithelwundflächen gesetzt, indem die Zellen weggekratzt wurden. Herumschwimmende Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und das Medium mit 10%haltigen FCS wurde durch ein Medium mit 1%haltigen FCS ersetzt. Die Wundränder wurden unter dem Mikroskop bzgl. ihrer Qualität begutachtet. Nur klar zu erkennende Ränder wurden für den Versuch ausgewertet. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml und 100 ng/ml CCL20 oder mit 1% FCS stimuliert und nach 24 h mit PBS gewaschen und anschließend mit Ethanol fixiert. Die Zahl, der über den Wundrand hinaus gewanderten Zellen, wurde unter einem Mikroskop (Olympus IX50, 10 x Vergrößerung) gezählt. Sowohl für die mit CCL20-stimulierten, als auch für die mit Medium-stimulierten Zellen, wurden drei Platten doppelblind analysiert, wobei für jede Platte sechs separate Felder ausgezählt wurden, und hierbei darauf geachtet wurde, dass die ausgezählten Abschnitte alle gleich lang waren.

2.2.4.3 Apoptose-Assay

SW480-Zellen wurden in 6-well-Platten mit einer Dichte von $0,2 \times 10^6$ Zellen/well ausgesät. Für die Induktion des CD95-vermittelten Zell-Todesliganden wurden nach Serumentzug über 12 h die Zellen mit 100 ng/ml und 500 ng/ml anti-APO-1 mAb für 24 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst und in PBS aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 2000 rpm für 5 min wurde das Zellpellet in 200 μ l Nicolettipuffer resuspendiert und in diesem für mindestens 4 h und maximal 4 Tage bei 4°C aufbewahrt. Die Bestimmung der Anzahl toter Zellen erfolgte per FACS-Analyse.

-Nicolettipuffer: 0,1% Natriumcitrat, 0,1% Triton X-100, 50 μ g/ml Propidiumiodid
-FACS-Puffer: 140 mM NaCl, 2 mM KH_2PO_4 , 17 mM Na_2HPO_4 , 4 mM KCl, 8 mM LiCl, 3 mM NaN_3 , 1 mM Na_2EDTA , pH 7,37

2.2.5 Densitometrie

Die Quantifizierung von DNA-Banden in Agarosegelen erfolgte mit Hilfe der Software TINA, Version 2.09 (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt).

2.2.6 Statistik

Statistische Analysen wurden mit Hilfe des zweiseitigen Student-t-Tests durchgeführt. p-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von CCR6 und seinem Liganden CCL20 in intestinalen Epithelzellen und kolorektalen Zellen

Um zu ermitteln, ob CCR6 in intestinalen Epithelzellen (IEC) und CRC-Zellen exprimiert wird, und um ein IEC-Modell für die Analyse des CCL20/CCR6-Chemokin-Ligand-Rezeptor-Systems anwenden zu können, wurde die CCR6- und CCL20-mRNA-Expression in verschiedenen humanen CRC-abgeleiteten IEC-Zelllinien analysiert. Dazu gehörten die Zelllinien HCT116, Caco-2, DLD-1, HT-29, SW480 und T84. In RT-PCR-Analysen konnten sowohl eine CCR6-, als auch eine CCL20-mRNA-Expression in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 15A).

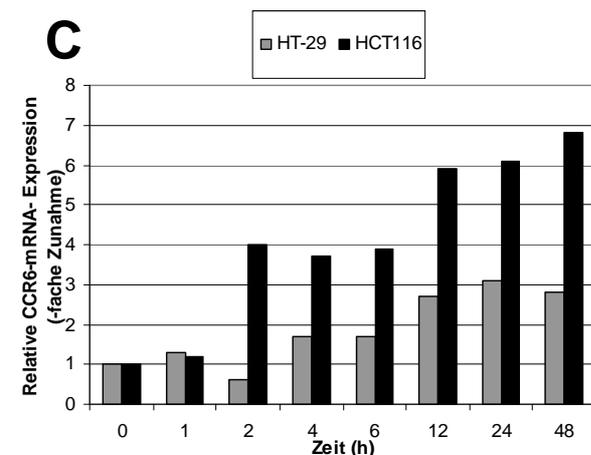
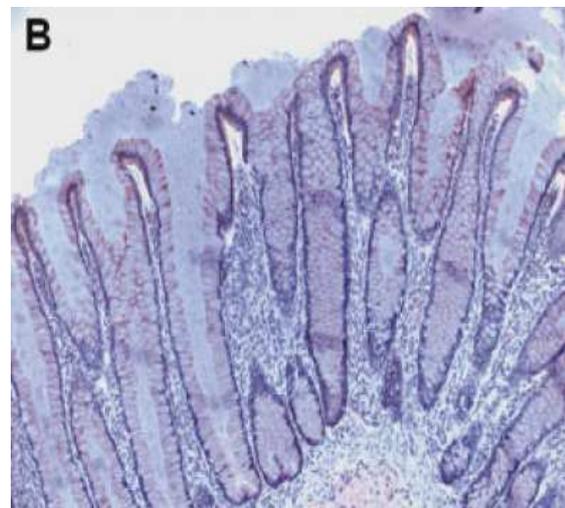
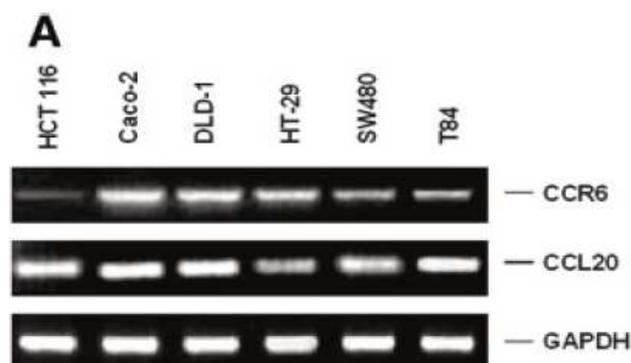


Abbildung 15: CCR6 ist in IEC exprimiert und seine Expression nimmt mit der Zelldifferenzierung zu. **A:** Expression von CCR6 und CCL20 in verschiedenen IEC-Linien unter Anwendung von RT-PCR-Analysen von mRNA, abgeleitet von IEC wie gezeigt. **B:** Immunhistochemie von normalem Kolongewebe mit humanen monoklonalen Anti-CCR6-Antikörpern²⁹. CCR6 ist überwiegend in differenzierten apikalen IEC exprimiert. **C:** Quantitative PCR-Analysen von HT-29- und HCT116-Zellen, die mit 5 mM Natriumbutyrat für bestimmte Zeitintervalle stimuliert wurden. Der mRNA-Spiegel von CCR6 wurde nach dem Aktin-Spiegel normalisiert und zeigt in beiden Zelllinien eine deutliche Zunahme verglichen mit dem CCR6-mRNA-Spiegel zum Zeitpunkt 0 h.

In Kolonbiopsien von normalem Kolongewebe wurde mit Hilfe der Immunhistochemie und unter Anwendung des humanen monoklonalen Anti-CCR6-Antikörpers

nachgewiesen, dass CCR6 in ursprünglichen IEC und hier vorzugsweise in den differenzierten apikalen Anteilen exprimiert wird (Abb. 15B).

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der Zelldifferenzierung auf die CCR6-Expressionslevel in IEC untersucht. Dabei ist die Natriumbutyrat-Stimulation als etabliertes Modell der IEC-Differenzierung verwendet worden^{21,71}. Eine zunehmende Zelldifferenzierung verstärkte die CCR6-mRNA-Expression in HT-29-Zellen um das 3,1-fache nach 24 h und in den HCT116-Zellen sogar um das 6,7-fache nach 48 h (Abb. 15C). In ähnlicher Weise gab es ein klares Verteilungsmuster der CCR6-Färbung in normalen IEC, beginnend in der Mitte und zunehmend in Richtung des oberen Drittels der Krypten, mit der höchsten Expression in den am meisten differenzierten Epithelzellen (Abb. 15B und 16A).

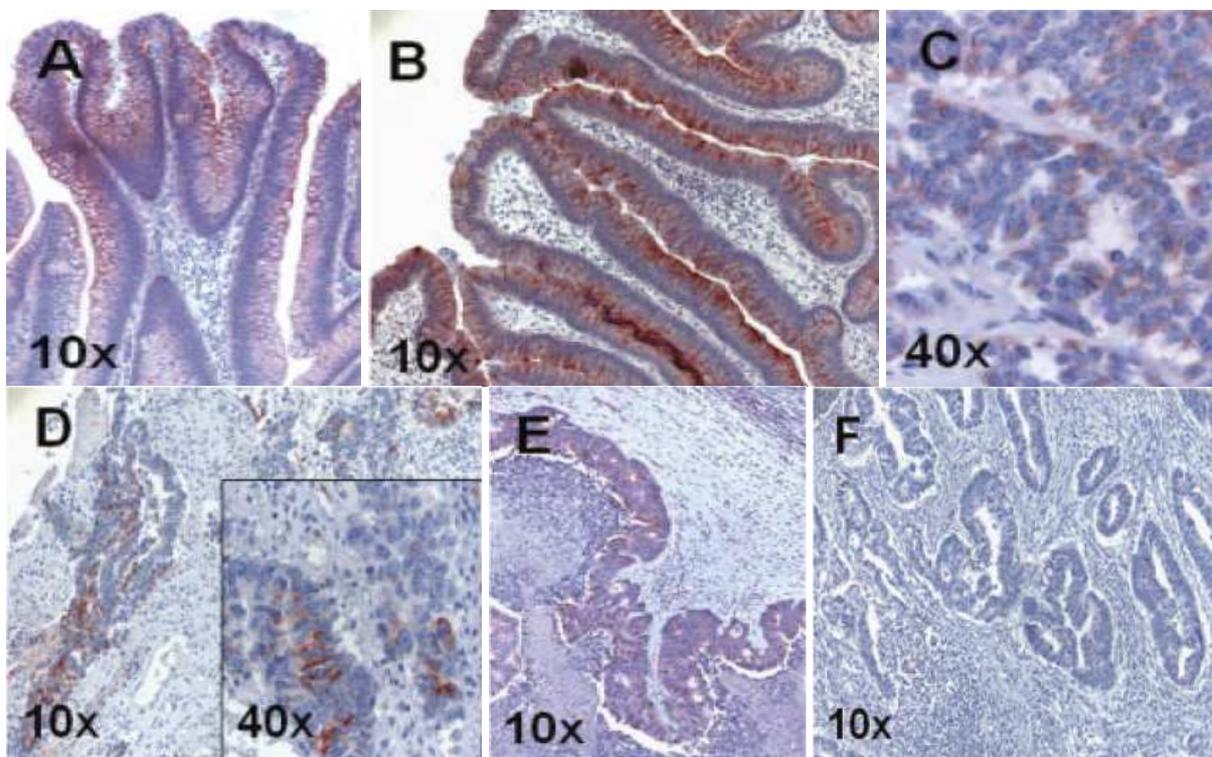


Abbildung 16: CCR6-Expression von IEC in kolorektalen Adenomen, CRC und CRC-Metastasen. Hier sind Beispiele von immunhistochemischen Analysen gezeigt, bei denen insgesamt 4 kolorektale Adenome, 15 CRC, 4 CRC-Lymphknotenmetastasen und 6 CRC-Lebermetastasen untersucht wurden. **A:** Die Immunfärbung mit dem humanen monoklonalen Anti-CCR6-Antikörper von einer histologischen Sektion eines kolorektalen Adenoms zeigt, dass die CCR6-Expression in den mehr differenzierten, apikalen IEC erhöht ist. **B:** Kolorektales Adenom, das mit dem humanen monoklonalen Anti-CCL20-Antikörper gefärbt wurde, zeigt ebenfalls eine hohe CCL20-Expression. **C:** CRC gefärbt mit Anti-CCR6. **D:** CRC gefärbt mit Anti-CCL20. **E:** Lymphknotenmetastasen gefärbt mit Anti-CCR6. **F:** CRC-Sektion gefärbt mit Anti-CCL20 zeigt eine geringere CCL20-Expression.

Bisher wurde gezeigt, dass CCR6 und sein Ligand CCL20 in Zelllinien exprimiert werden, die vom CRC abgeleitet werden (Abb. 15A). Als Nächstes wurde eine umfassende immunhistochemische Analyse durchgeführt, um die CCR6- und CCL20-

Expression in humanen kolorektalen Karzinomgewebe und kolorektalen Karzinometastasen zu untersuchen. Dafür wurden von 15 unterschiedlichen Patienten Gewebeproben entnommen. Diese Biopsien beinhalteten Gewebe mit einer Vielzahl von CRC in unterschiedlichen Stadien der Invasion und Differenzierung (histologisches Grading G1-G4).

	TNM	Grading	CCL20-Expression	CCR6-Expression
Kolorektale Adenome (CRA)				
CRA 1	N/A	N/A	++	+
CRA 2	N/A	N/A	++	+
CRA 3	N/A	N/A	+	+
CRA 4	N/A	N/A	+	+
Kolorektale Karzinome (CRC)				
CRC1	T1N0M0	G1	-	(+)
CRC2	T2N0M0	G2	+	++
CRC3	T3N0M0	G2	(+)	+
CRC4	T3N0M0	G2	(+)	+
CRC5	T3N0M0	G2	+	(+)
CRC6	T3N0M0	G3	-	+
CRC7	T3N0M0	G3	+	+
CRC8	T3N0M1	G2	+	(+)
CRC9	T3N1M0	G2	(+)	+
CRC10	T3N1M1	G2	(+)	+
CRC11	T3N2M0	G2	+	+
CRC12	T3N2M0	G4	-	++
CRC13	T3N2M1	G3	+	(+)
CRC14	T4N2M0	G3	-	(+)
CRC15	T4N1M1	G2	-	++
Lymphknotenmetastasen (LNM)				
LNM1	T3N2M0	G2	+	++
LNM2	T3N1M1	G2	+	+
LNM3	T3N2M1	G3	-	(+)
LNM4	T4N2M0	G3	-	(+)
Lebermetastasen (LM)				
LM1	T2N0M1	G2	-	(+)
LM2	T3N0M1	G2	-	+
LM3	T3N1M1	G2	-	(+)
LM4	T3N1M1	G2	-	(+)
LM5	T3N1M1	G3	-	(+)
LM6	T3N1M1	G3	-	+

Tabelle 9: Resultate der semiquantitativen immunhistochemischen Analysen von CCL20 und CCR6. Die Proteinexpressionen wurden in kolorektalen Adenomen, CRC, CRC-Lymphknotenmetastasen und CRC-Lebermetastasen untersucht. CRC und CRC-Metastasen sind bezüglich der Ergebnisse ihrer TNM-Klassifikation angeordnet. Alle Biopsien wurden betreffend ihrer CCL20- und CCR6-Immunfärbungs-Intensität durch zwei erfahrene Pathologen blind nach Klinik, TNM und nach den Informationen der Behandlung skaliert. Skalierung: -, keine Expression; (+), partielle/niedrige Expression; +, mäßige Expression; ++, starke Expression.

Zusätzlich wurde das Gewebe von CRC-Lymphknotenmetastasen (n=4), Lebermetastasen (n=6) und kolorektalen Adenomen (n=4) analysiert. Während die normale Kolonmukosa und alle vier kolorektalen Adenomen eine positive Färbung für die CCL20-Proteinexpression (Abb. 16B) zeigten, gab es keine Färbung bei den Lebermetastasen und nur die Hälfte der Lymphknotenmetastasen exprimierten entsprechend den immunhistologischen Untersuchungen CCL20. In ähnlicher Weise traten Verluste der CCL20-Expression in 9 von 15 kolorektalen Karzinomen auf oder

waren im Vergleich zu normalem Kolongewebe vermindert, was vermuten lässt, dass CCL20 in kanzerogenen und metastatischen Gewebe minimiert ist (Tabelle 9, Abb. 16D, 16F). Darüber hinaus waren die invasiveren CRC und die CRC-Metastasen bezogen auf die TNM-Klassifikation diejenigen, wo eine CCL20-Expression am wenigsten wahrscheinlich war (Tabelle 9). Zum Beispiel exprimiert keiner der drei T4 Tumore/Metastasen CCL20 (Tabelle 9). Alle CRC und CRC-Metastasen wiesen, zumindest fokal, eine positive Färbung für CCR6 auf (Tabelle 9, Abb. 16C, 16E). Dennoch verringerte sich die Zahl, der hoch oder nur mäßig CCR6-exprimierenden Gewebeproben von 100% in kolorektalen Adenomen zu 66,6% in CRC, zu 50% in den Lymphknotenmetastasen und zu nur 33% in den Lebermetastasen, was wiederum - ähnlich den Ergebnissen von Abbildung 15B und 15C - vermuten lässt, dass die CCR6-Expression in differenzierten Geweben höher ist.

3.2 Regulation der CCL20-mRNA-Expression in intestinalen Epithelzellen durch proinflammatorische Zytokine

Bereits bei mehreren Chemokinen wurde gezeigt, dass sie durch proinflammatorische Zytokine aktiviert werden. Aufgrund dessen wurden LPS und die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β bzgl. deren Einfluss auf die CCL20-mRNA-Expression analysiert. In diesen Experimenten wurde die humane IEC-Linie HT-29 mit LPS (1 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) oder IL-1 β (10 ng/ml) stimuliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass LPS die CCL20-mRNA-Expression mit einem Peak nach 4 h um fast das Zweifache erhöht (Abb. 17A). Ähnlich zu den Ergebnissen von LPS, erhöhten ebenfalls die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β die CCR6-mRNA-Expression um das 2,4 bis 2,5-fache (Abb. 17B, 17C). Zusätzlich zu den proinflammatorischen Stimuli (Abb. 17A-C), steigerte CCL20 selbst seine eigene mRNA-Expression in IEC (Abb. 17D). Die Induktion der CCL20-mRNA-Expression war biphasisch mit einem Peak-Expressionslevel nach 2 und 24 h, was einem Expressionsmuster entspricht, das schon früher für andere proinflammatorische Zytokine beschrieben wurde. Dazu gehört zum Beispiel das Chemokin ENA-78/CXCL5, das nach der Stimulation von proinflammatorischen Zytokinen ebenfalls eine deutliche Aktivierung zeigt¹³². Diese Tatsachen lassen darauf schließen, dass CCL20 die Expression von proinflammatorischen Zytokinen erhöht, resultierend in dem zweiten CCL20-mRNA-Peak. Diese Hypothese wurde in den folgenden Experimenten untersucht.

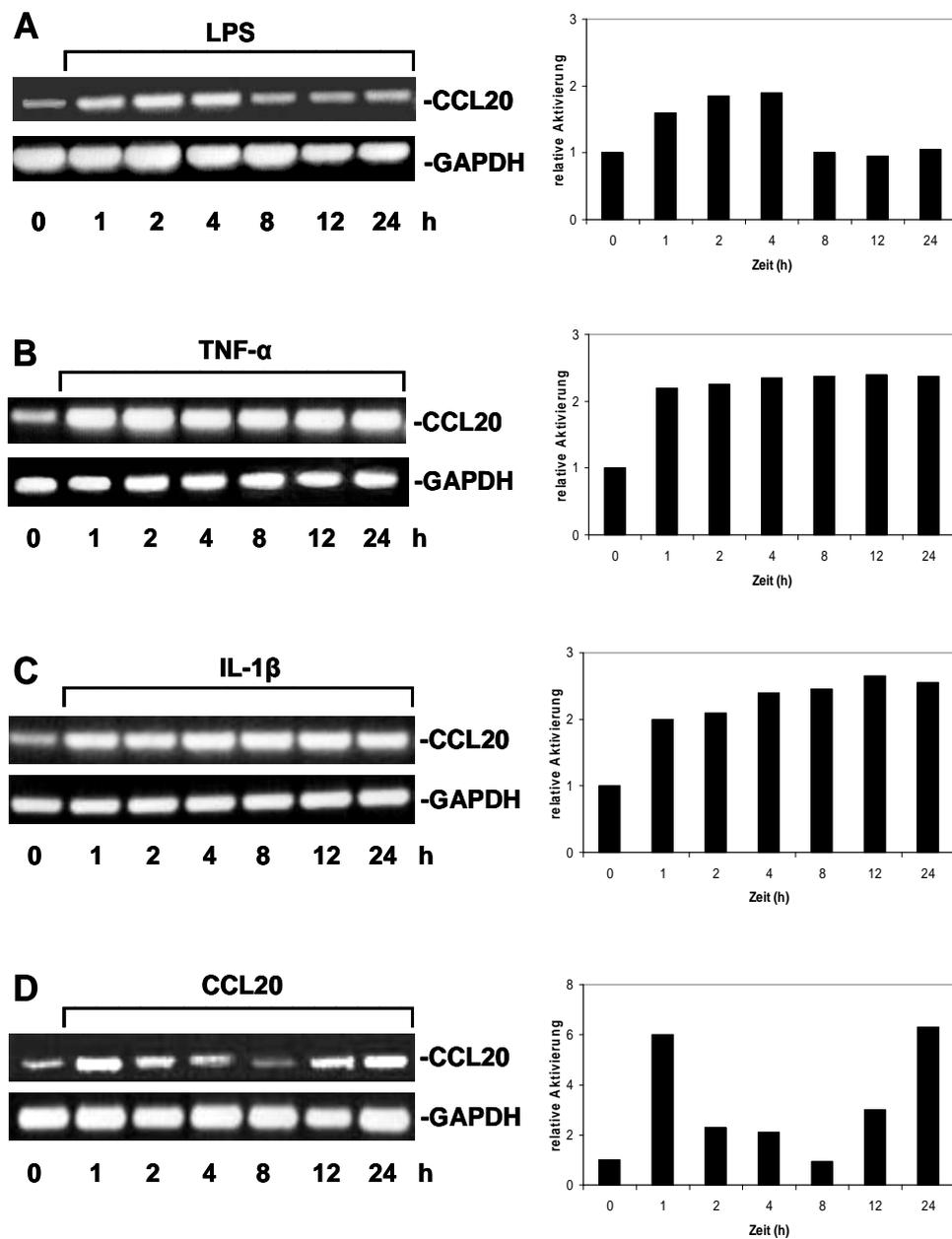


Abbildung 17: CCL20-mRNA-Expression ist nach der Stimulation mit verschiedenen proinflammatorischen Stimuli erhöht. Regulation von CCL20-mRNA-Expression nach der Stimulation mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$; **17A**) mit TNF- α (50 ng/ml; **17B**), IL-1 β (10 ng/ml; **17C**) und mit CCL20 (100 ng/ml; **17D**). Der Expressionsspiegel der CCL20-mRNA wurde mit Hilfe der TINA-Software an den GAPDH-Spiegel angepasst.

3.3 Aktivierung von CCL20-mRNA in entzündlichen Kolonläsionen bei M. Crohn-Patienten und Korrelation mit den IL-8-mRNA-Expressionspegeln

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die CCL20-mRNA-Expression mit dem Grad der Entzündung in vivo korreliert. Zu diesem Zweck wurde unter der Anwendung der Real-Time-PCR die CCL20-mRNA-Expressionsspiegel verglichen. Dazu wurden von insgesamt 7 Patienten mit M. Crohn 14 Gewebeproben von einer endoskopisch (makroskopisch) entzündeten Kolonmukosa mit 14 Biopsien von einer endoskopisch nicht-entzündeten Kolonmukosa verglichen. Alle Gewebeproben stammten von denselben 7 Patienten. Die IL-8-Expression, die als Kontrollmarker für die Entzündung verwendet wurde, war signifikant ($p < 0,05$) in den entzündeten Biopsien erhöht (Tabelle 10). Die Zunahme der IL-8-mRNA-Expression reichte von dem 1,4 bis zum 31,1-fachen, verglichen mit den nicht-entzündeten Geweben. In ähnlicher Weise waren die CCL20-mRNA-Expressionslevels in Gewebeproben mit entzündlicher Mukosa signifikant höher ($p < 0,05$) als bei den verglichenen nicht-entzündlichen Läsionen (Zunahme zwischen dem 1,9 und 16,7-fachen; Tabelle 10).

Patient Nr.	Aktuelle Medikation	Anatomische Lage der Biopsien		CCL20-Expressionslevel entzündet vs. nicht-entzündet	IL-8-Expressionslevel entzündet vs. nicht-entzündet	Korrelation CCL20/IL-8
		Nicht-Entzündet	Entzündet			
1*	AZA, IFX	Coecum*	Terminales Ileum*	1,93	4,5	0,985
2	Mesalazin	Colon descendens	Colon descendens	3,69	11,67	0,636
3	AZA	Coecum	Coecum	16,73	11,08	0,372
4*	Mesalazin, Kortikosteroide	Coecum*	Terminales Ileum*	3,41	1,52	0,497
5	Keine Medikation	Colon descendens	Colon descendens	2,15	1,41	0,999
6	MTX	Colon transversum	Colon transversum	12,27	31,12	0,955
7	AZA	Colon transversum	Colon transversum	2	2,24	0,542
Durchschnitt ± SEM				6,03 ± 2,11	9,08 ± 3,76	0,71 ± 0,09

Tabelle 10: Vergleich von CCL20- und IL-8-mRNA-Expression in entzündeten und nicht-entzündeten Kolonläsionen von Patienten mit Morbus Crohn. CCL20-Expression wurde durch quantitative PCR gemessen und auf die beta-Aktin-Expressionsspiegel bezüglich der DNA-Herstellung normiert. Um die Expressionsspiegel zwischen entzündeten und nicht-entzündeten Kolonläsionen zu vergleichen, wurde die mRNA-Expression in den nicht-entzündeten Geweben auf 1,0 (100%) gesetzt. Die aktuelle medikamentöse Therapie, unter der die Biopsien entnommen wurden, sowie die anatomische Lage, von der die Proben stammen, sind für alle Patienten angegeben (AZA Azathioprin, IFX Infliximab, MTX Methotrexat). Die Entnahmen der einzelnen Gewebeproben für entzündete und nicht-entzündete Läsionen waren für dieselben Kolon- und Ileumsegmente vorgesehen. Dies war nicht möglich bei den mit Sternchen (*) gekennzeichneten Patienten aufgrund einer massiven Entzündung im gesamten anatomischen Segment. Daher wurden zum Vergleich Biopsien von angrenzenden (nicht-entzündeten) Segmenten eingeschlossen.

Darüber hinaus korrelierten die mRNA-Spiegel stark mit den IL-8-mRNA-Expressionsspiegeln ($r = 0,71 \pm 0,09$), was seine Assoziation mit der intestinalen Entzündung zeigt.

Bis jetzt konnte gezeigt werden, dass die CCL20-mRNA-Expression in hohem Grade mit den IL-8-Spiegeln bei M. Crohn korreliert, und dass CCL20 seine eigene mRNA-Expression in IEC erhöht. Im nächsten Schritt wurde analysiert, ob CCL20 die IL-8-Spiegel in IEC erhöht. Zu diesem Zweck wurden HT-29-Zellen mit 100 ng/ml CCL20 stimuliert und die IL-8-Protein-Expression durch ELISA gemessen. Eine CCL20-Stimulation erhöhte das IL-8-Proteinlevel um das 4,6-fache nach 24 h (Abb. 18).

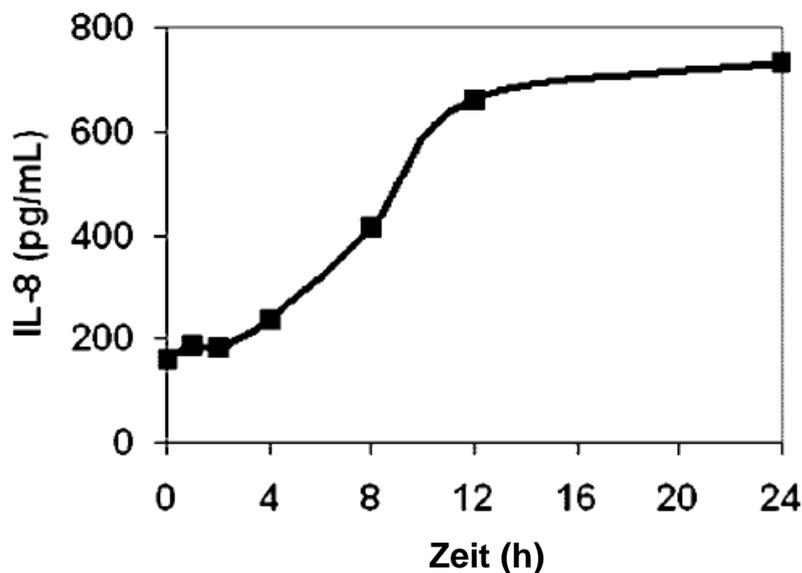


Abbildung 18: CCL20 erhöht die IL-8-Expression in HT-29 Zellen. IL-8-Proteinexpression, gemessen in ELISA-Assays, ist nach der Stimulation mit rekombinanten humanen CCL20 (100 ng/ml) um das 4,6-fache erhöht.

3.4 MEK-1 abhängige Aktivierung von ERK-1/2 MAP-Kinasen durch CCR6

Bis jetzt konnte gezeigt werden, dass CCR6 funktionell in IEC zu einer erhöhten Expression der proinflammatorischen Chemokine CCL20 und IL-8 führt. Als nächstes wurden wichtige Signaltransduktionswege von CCR6 in IEC untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien SW480 und HT-29, die beide CCR6 exprimieren, mit dem CCR6-Liganden CCL20 stimuliert. Die Stimulation von Chemokin-Rezeptoren kann zu einer vorübergehenden Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP) führen^{45,145}. In gleicher Weise induzierten 100 ng/ml CCL20 eine vorübergehende Aktivierung von ERK-1/2 (Abb. 19A). Um die vorgeschalteten Signalereignisse zu identifizieren, wurde der Effekt des MEK-1-Inhibitors PD98059 auf die CCL20-vermittelte ERK-Regulation untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor PD98059 die ERK-1/2-Phosphorylierung nach der CCL20-

Stimulierung verringert (Abb. 19B), was zeigt, dass die CCL20-induzierte ERK-1/2-Aktivierung MEK-1-abhängig ist.

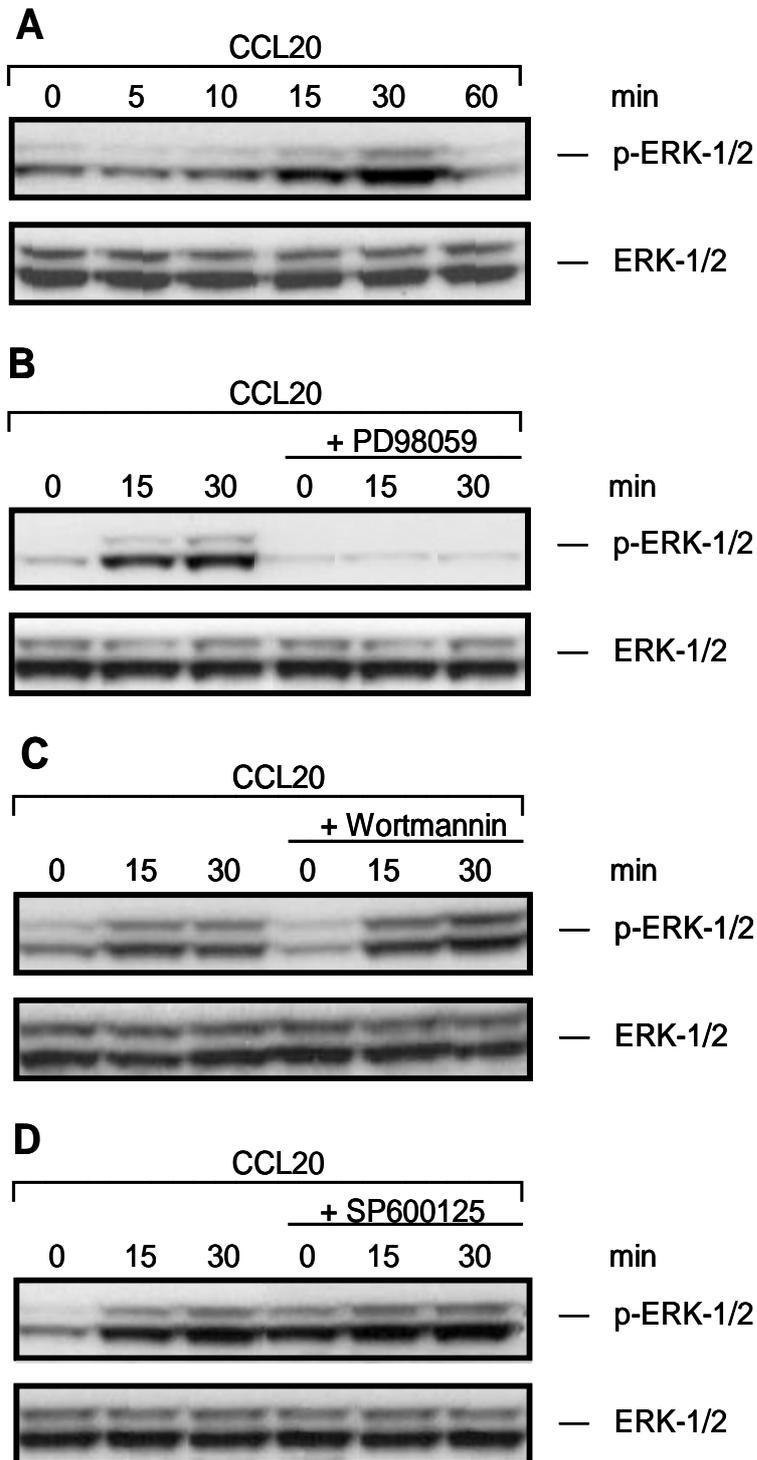


Abbildung 19: CCL20 aktiviert ERK-MAP-Kinasen in SW480-Zellen. Die Aktivierung und Expression von Phospho-ERK-1/2 wurde durch Immunoblots beurteilt. **A:** Phospho-ERK-1/2-Aktivierung nach CCL20-Stimulation (100 ng/ml). **B:** Die CCL20-ERK-Aktivierung ist MEK-1 abhängig. Eine Vorbehandlung mit dem MEK-1-Inhibitor PD98059 (10 µmol/L 1 h vor der CCL20-Stimulation) ergab eine verminderte ERK-Aktivierung. **C:** Die CCL20-induzierte ERK-Aktivierung ist PI3-Kinasen-unabhängig. Die Vorbehandlung mit PI3-Kinasen-Inhibitor Wortmannin (25 µmol/L) beeinflusste die ERK-1/2-Aktivierung nicht. **D:** In ähnlicher Weise ist die ERK-Aktivierung unabhängig von dem SAPK/JNK-Signal. Die Vorbehandlung mit dem SAPK/JNK-Inhibitor SP600125 (20 µmol/L) hatte keinen Einfluss auf die ERK-1/2-Aktivierung. Ähnliche Ergebnisse wurden für HT-29 gefunden (Daten hier nicht gezeigt). Ein repräsentatives Experiment (n=3) ist abgebildet.

Es konnte gezeigt werden, dass zwischen dem PI3-Kinasen- und dem MEK-ERK-Signaltransduktionsweg z.T. Interaktionen (cross talk) bestehen¹²². Allerdings zeigte sich bei der Vorbehandlung mit Wortmannin kein signifikanter Einfluss der ERK-Phosphorylierung nach der Stimulierung mit CCL20 (Abb. 19C), was wiederum eine

PI3-Kinasen- unabhängige Aktivierung von ERK-MAP-Kinasen durch CCL20 vermuten lässt. Ähnlich zu diesen Ergebnissen zeigte sich, dass der JNK-Kinasen-Inhibitor SP600125 die CCL20 induzierte ERK-Phosphorylierung nicht beeinflusst (Abb. 19D).

3.5 SAPK/JNK- und Akt-Phosphorylierung durch CCR6-Aktivierung

Die Aktivierung von Chemokin-Rezeptoren führt häufig zu einer Aktivierung von p38- und SAPK/JNK-Kinasen ^{46,120,137}. Die Stimulation von SW480- und HT-29-Zellen ergab eine Phosphorylierung der SAPK/JNK-Kinasen (Abb. 21A). Eine Vorbehandlung mit dem JNK-Inhibitor SP600125 unterdrückte signifikant die Phosphorylierung der JNK-Kinasen (Abb. 21B), und zwar in gleicher Weise, wie bei der Vorbehandlung mit dem MEK-1-Inhibitor PD98059. Dies lässt auf einen MEK-1 abhängigen Signaltransduktionsweg schließen (Abb. 21C). Im Gegensatz dazu beeinflusste der PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin den Grad der Phosphorylierungen nicht (Abb. 21D). Außerdem ergab die Stimulation mit CCL20 nur eine schwache Zunahme der Phosphorylierung von p38 (Abb. 20), was darauf schließen lässt, dass CCL20 in erster Linie ERK- und JNK-MAP-Kinasen in IEC aktiviert.

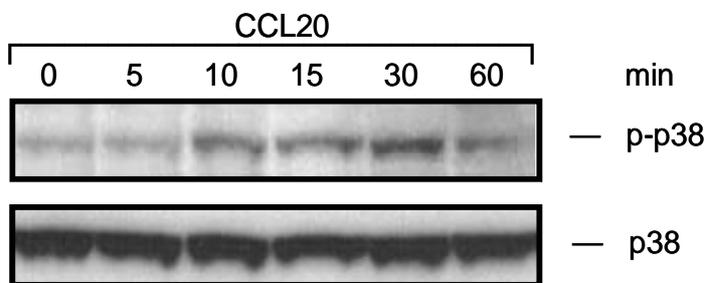


Abbildung 20: CCL20 induziert in SW480-Zellen nur eine geringe p38-Aktivierung.

Darüber hinaus zeigte die Bindung von CCL20 an seinen Rezeptor CCR6 ebenfalls eine gesteigerte Phosphorylierung von Akt (Abb. 22A). Eine Vorbehandlung mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin inhibierte die CCL20-induzierte Akt-Phosphorylierung vollständig (Abb. 22B), während eine Vorbehandlung mit dem MEK-1-Inhibitor PD98059 (Abb. 22C) und dem SAPK/JNK-Inhibitor SP600125 (Abb. 18D) die Akt-Aktivierung nicht beeinflusste. Dies legt wiederum einen PI3-Kinase abhängigen, aber MEK-1 und SAPK/JNK unabhängigen Signaltransduktionsweg nahe.

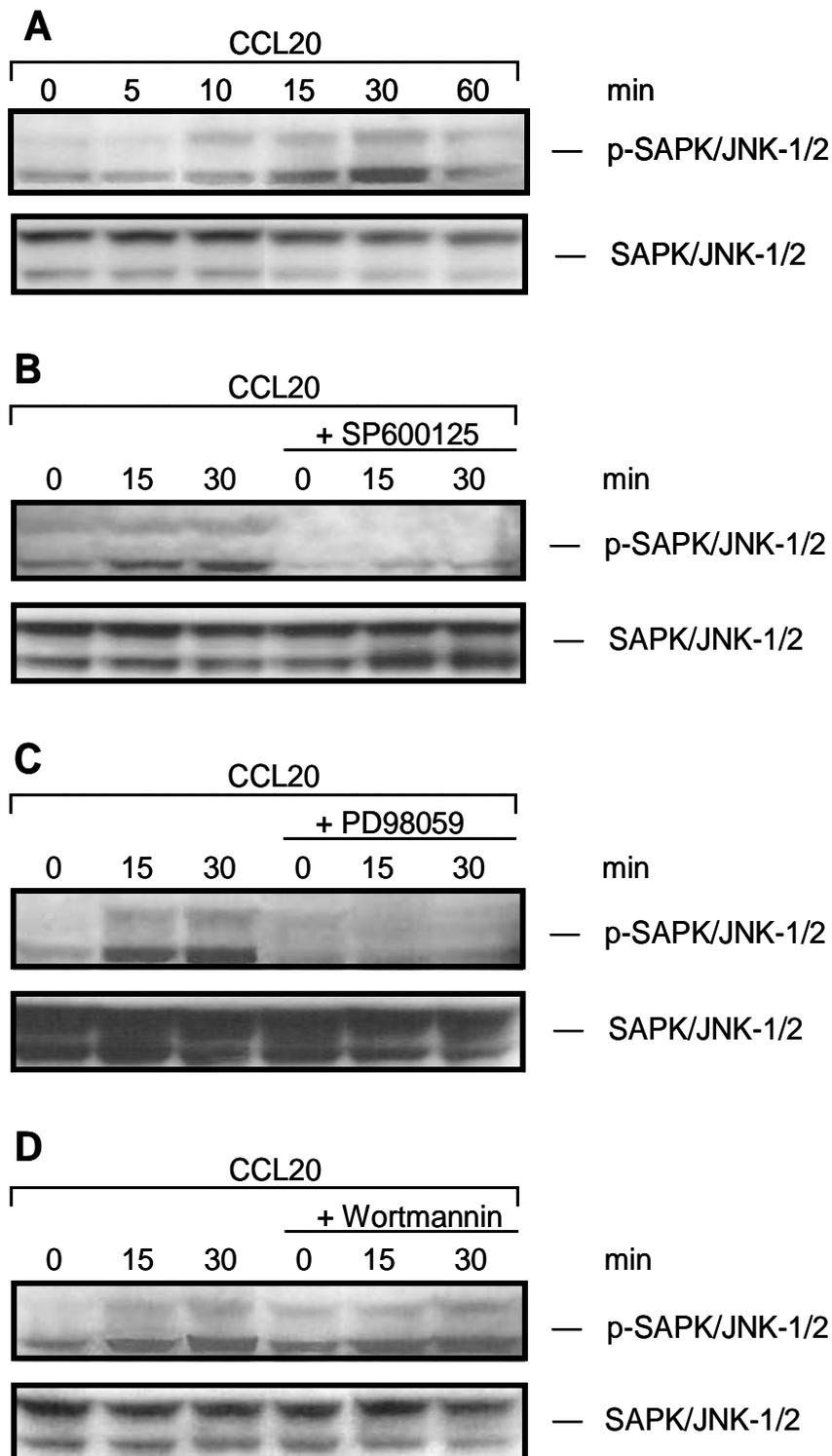


Abbildung 21: CCL20-Stimulation aktiviert SAPK/JNK-1/2. **A:** Die Stimulation von SW480-Zellen mit CCL20 (100 ng/ml) führte zu einer gesteigerten Phosphorylierung von SAPK/JNK-Kinasen. **B:** Eine Vorbehandlung mit dem SAPK/JNK-Inhibitor SP600125 (20 μ mol/L) verminderte die SAPK/JNK-Aktivierung. **C:** Die SAPK/JNK-Aktivierung ist MEK-1 abhängig. Eine Vorbehandlung mit dem MEK-1-Inhibitor (PD98059, 10 μ mol/L) verringerte die JNK-Aktivierung. **D:** Der PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin (25 μ mol/L) annullierte die CCL20 induzierte SAPK/JNK-Aktivierung nicht. Ähnliche Ergebnisse wurden für HT-29 gefunden (Daten hier nicht gezeigt). Ein repräsentatives Experiment (n=3) ist abgebildet.

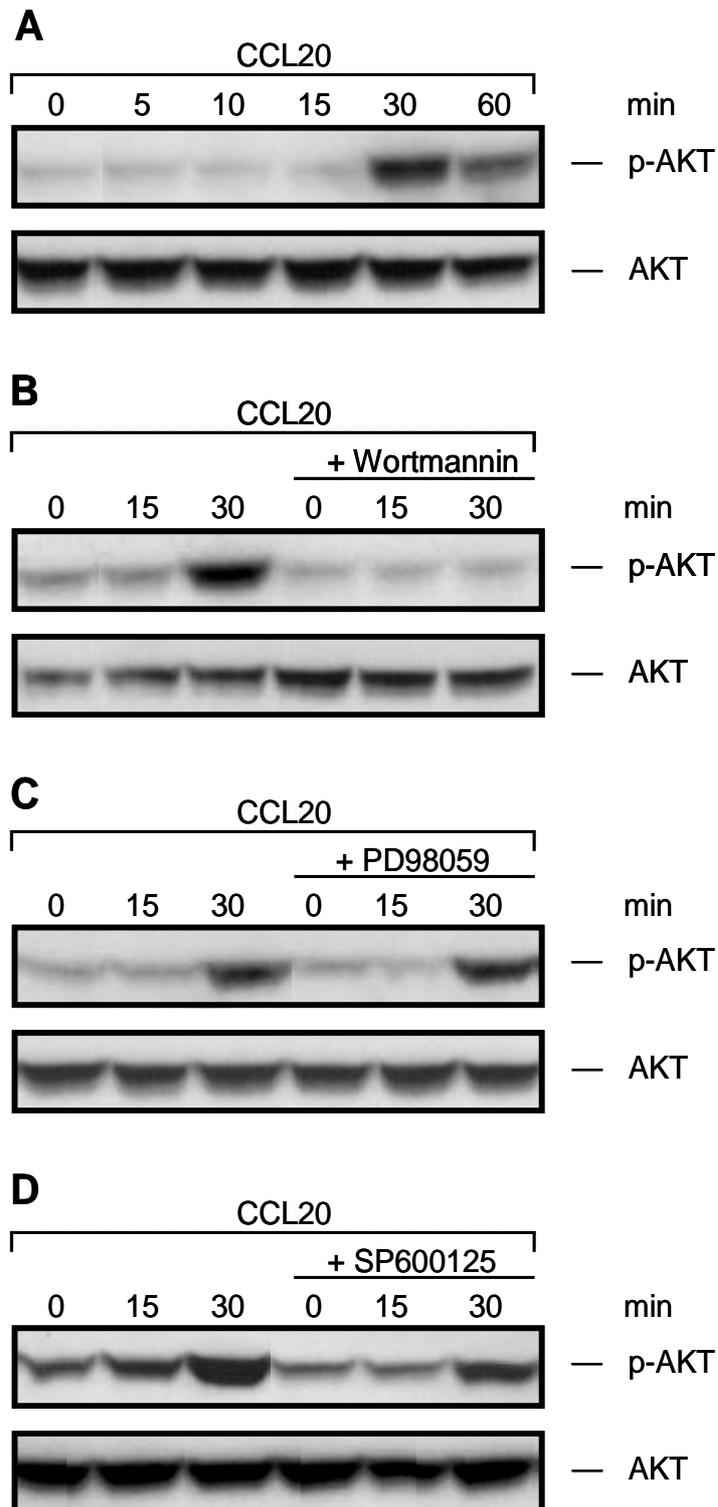


Abbildung 22: CCL20 induziert Akt-Aktivierung in SW480-Zellen.

A: CCL20 (100 ng/ml) bewirkt eine Akt-Phosphorylierung. **B:** Eine Vorbehandlung mit dem PI3-Kinasen-Inhibitor Wortmannin (25 $\mu\text{mol/L}$) inhibiert eine Akt-Phosphorylierung. **C:** Durch eine Vorbehandlung mit dem MEK-1-Inhibitor PD98059 zeigte sich kein Effekt bezüglich der Akt-Phosphorylierung. **D:** In gleicher Weise beeinflusste der JNK-Inhibitor SP600125 (20 $\mu\text{mol/L}$) die Akt-Phosphorylierung nicht. Ähnliche Ergebnisse wurden für HT-29 gefunden (Daten hier nicht gezeigt). Ein repräsentatives Experiment ($n=3$) ist abgebildet.

3.6 Stimulation der intestinalen Epithelzellproliferation durch CCL20

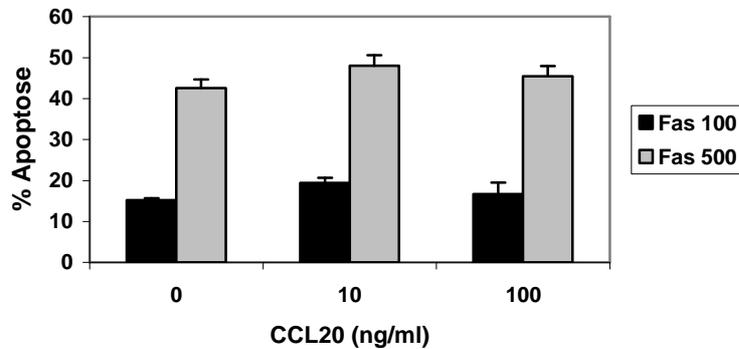
Es konnte nachgewiesen werden, dass die CCL20-Stimulation eine ERK-1/2- und eine Akt-Aktivierung ergibt. Für diese Stimulation wurde bereits gezeigt, dass sie anti-apoptotische Signaltransduktionswege und eine Zunahme der Zellproliferation vermittelt^{35,42}. Sowohl die Zellproliferation, als auch die Apoptose sind wichtige Mechanismen, durch die die intestinale Barriere und ihre Restitution (z.B. bei intestinaler Entzündung) kontrolliert werden. Darüber hinaus wurde bereits eine gesteigerte Zellproliferation und eine verminderte Apoptose in kanzerogenem Gewebe gezeigt, was zu einem ausgedehnten Tumorwachstum und Resistenz gegen „apoptotische“ und antiproliferative Therapiestrategien führte³⁹. Deshalb wurde der Chemokin-vermittelte Effekt auf die Apoptose unter Verwendung eines Apoptose-Assays untersucht. In diesen Experimenten wurden SW480-Zellen verwendet, da sie weniger widerstandsfähig gegenüber einer Fas-induzierten Apoptose sind als die HT-29-Zellen¹. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Zahl der apoptotischen Zellen in der mit Chemokin-stimulierten Gruppe und der unstimulierten Gruppe gefunden werden (Abb. 23A). Im Gegensatz dazu führte CCL20 bei einer Konzentration von 10 ng/ml und 100 ng/ml zu einer signifikant gesteigerten Zellproliferation ($p < 0,05$ bzw. $p = 0,006$), wohingegen höhere Konzentrationen die Zellproliferationsrate nicht signifikant änderten (Abb. 23B).

3.7 Einfluss der CCR6-Aktivierung auf die Zellmigration

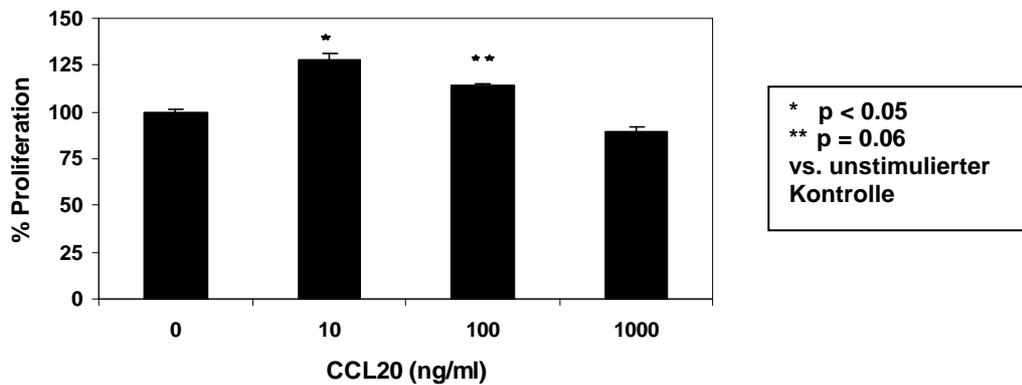
Die Aktivierung von MAP-Kinasen wie z.B. ERK-1/2 und die Aktivierung von Akt sind verbunden mit der Zellmigration⁷, die einen höheren Mechanismus der Wundheilung nach einer Verletzung der IEC-Barriere darstellt. Die Zellmigration findet sich aber nicht nur bei Entzündungen, sondern ist auch ein Hauptcharakteristikum des kolorektalen Karzinomwachstums. Deshalb wurde in Zellmigrationsassays untersucht, ob CCL20 migrationssteigernd für IEC wirkt. Zu diesem Zweck wurden standardisierte sterile Wunden in SW480-Zellkulturen erzeugt, da diese Zelllinie die am besten geeignete CCR6-exprimierende intestinale Epithelzelllinie für die Wounding-Assays in Pilotexperimenten war. 24 h nach dem Setzen der Wunde wurde die Zahl der über die Wundkante gewanderten Zellen unter einem Mikroskop gezählt. Um die CCL20-vermittelte Zellmigration zu quantifizieren wurden insgesamt 18 Felder in drei verschiedenen Platten untersucht, wobei jede ausgezählte Gruppe mehr als 300 gewanderte Zellen beinhaltete. Dieses Experiment stellte somit eine

statistisch signifikante Zunahme der Zellmigrationsrate in CCL20-stimulierten Zellen im Vergleich zu den mit Medium-stimulierten Kontrollen fest ($p=0,001$ für 10 ng/ml CCL20; $p=0,005$ für 100 ng/ml CCL20; Abb. 23C).

A



B



C

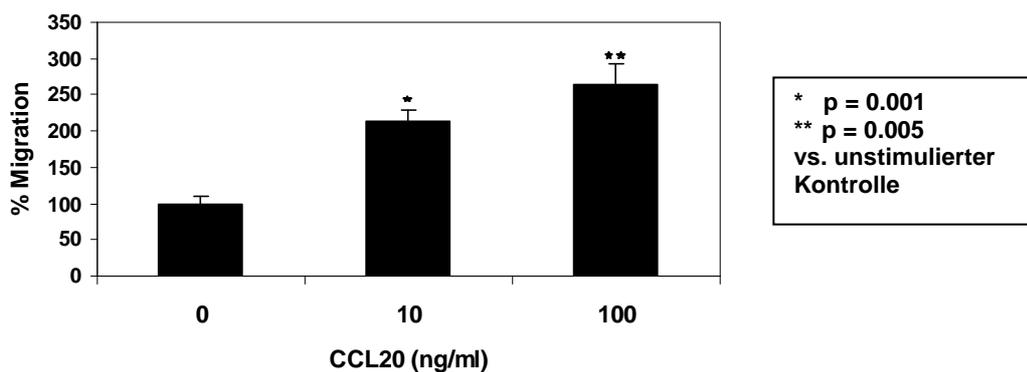


Abbildung 23: CCL20 reguliert die Apoptose nicht, erhöht aber die Zellproliferation und die Zellmigration in IEC-Zellen. **A:** CCL20 beeinflusst die Fas-Ligandenvermittelte Apoptose in SW480-Zellen nicht. Die Zellen wurden mit 100 und 500 ng/ml anti-APO-1-Antikörper behandelt und für 24 h entweder mit CCL20 stimuliert oder unstimuliert gelassen. Die Apoptose wurde durch FACS-Analysen bestimmt. **B:** CCL20 steigert die Zellproliferation in HT-29-Zellen. Es gab eine statistisch signifikante Zunahme ($p < 0,05$ und $p = 0,006$) in der Zellproliferation, als die Zellen mit CCL20 (10 ng/ml und 100 ng/ml) stimuliert wurden. Die Zellproliferationsrate wurde durch den MTS-Assay nach 48 h bestimmt. Das relative Mittel \pm SEM von drei

unabhängigen Experimenten ist dargestellt. **C:** Wounding-Assays wurden verwendet, um den Einfluss von CCL20 auf IEC-Migration zu analysieren. 24 h nach dem Setzen der Wunde, sind die über den Wundrand gewanderten Zellen unter einem Mikroskop gezählt wurden. Dabei zeigte sich, dass CCL20 eine signifikante Zunahme der Zellmigrationsrate induziert (10 ng/ml CCL20: $p=0,001$; 100 ng/ml CCL20: $p=0,005$ vs. mit Medium-stimulierten Kontrollen).

4. Diskussion

4.1 Die Bedeutung der CCR6-Expression im Gastrointestinaltrakt

Chemokine sind chemotaktische Zytokine, die die Migration von Leukozyten zu Orten von Gewebsverletzungen, Infektionen oder Tumoren induzieren können^{5,17,103,167}. Mehrere Studien konnten bis jetzt zeigen, dass bestimmte Chemokine und Chemokin-Rezeptoren eine entscheidende Rolle auch in IEC spielen^{11,12,14,36,71}. Ebenso demonstrierten Studien, dass Chemokin-Rezeptoren ausschlaggebend für die Auswahl des Ziels von metastatischen Tumorzellen sind^{12,48,97,120,141}.

Bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass IEC den CCR6-Liganden CCL20 exprimieren^{66,85,115,143}. In dieser Arbeit konnte nun zusätzlich nachgewiesen werden, dass auch sein Rezeptor CCR6 in diversen IEC-Linien (HT-29, SW480, T84, DLD-1, Caco-2, HCT116) exprimiert wird, was seine Bedeutung im Gastrointestinaltrakt widerspiegelt. Als weiterer wichtiger Aspekt demonstriert diese Arbeit, dass das Chemokin-Ligand-Rezeptor-Paar einen wichtigen Mediator für die intestinale Entzündung darstellt. So führte die Stimulierung von IEC mit proinflammatorischen Zytokinen und LPS zu einer signifikanten Erhöhung der CCL20-mRNA-Expression. Ein besonders starker und lang wirksamer CCL20-Expressionsaktivator ist das Zytokin TNF- α , welches ein wichtiger Regulator der epithelialen Funktion bei entzündlichen Prozessen ist. TNF- α ist bei chronisch entzündlichen Krankheiten wie rheumatoider Arthritis, Spondylarthropathien, Psoriasis vulgaris und CED hochreguliert und wird als zentraler Entzündungsmediator angesehen. Die Hauptproduzenten sind aktivierte Makrophagen und T-Lymphozyten. TNF- α aktiviert Leukozyten, induziert Akute-Phase-Proteine und Metalloproteinasen und inhibiert die Apoptose inflammatorischer Zellen. Es wurde gezeigt, dass die Anzahl TNF- α -produzierender Zellen in der Lamina propria des Darms von M. Crohn-Patienten erhöht ist¹⁵³. Ebenso ist TNF- α in der Darmmukosa von Patienten mit Colitis ulcerosa erhöht¹⁵³. Zudem werden durch TNF- α viele andere proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 β , IL-6 und auch IL-8, hochreguliert.

Für CCL20 konnte gezeigt werden, dass es seine eigene mRNA-Expression steigert, ein Mechanismus, der schon früher für andere proinflammatorische Zytokine und Chemokine, wie z.B. für Fractalkine¹¹, gezeigt wurde. Außerdem führte eine CCR6-Aktivierung in IEC zu einer gesteigerten Proteinexpression des proinflammatorischen Chemokins IL-8. Quantitative PCR-Analysen wiesen hierbei in Kolonbiopsien von M. Crohn-Patienten nach, dass die CCL20-Expression in den entzündeten Anteilen

gesteigert ist. Die CCL20-mRNA-Spiegel in diesen Proben korrelieren dabei stark mit dem IL-8-mRNA-Spiegel, was eine wichtige Rolle von CCL20 bei der Entzündung des Intestinums vermuten lässt. Diese Ergebnisse stimmen mit zeitgleich durchgeführten Studien anderer Arbeitsgruppen überein, die ebenfalls eine erhöhte CCL20-Expression in Biopsien von Patienten mit CED zeigen^{73,85,115}. Interessanterweise ließ sich eine zunehmende CCR6-Expression entlang der intestinalen Kryptenachse nachweisen mit einer niedrigen Expressionsrate an den Basen der Krypten gegenüber einer hohen Expressionsrate in den mehr differenzierten apikalen Zellen. Obwohl die CCR6-Expression in den normalen IEC mit der Zelldifferenzierung steigt, war diese Assoziation in den Geweben des CRC weniger ersichtlich. Im Gegensatz zu einer anderen veröffentlichten Studie war die hohe CCR6-Expression in den CRC-Metastasen bei uns weniger verbreitet, als in dem normalen Kolangewebe und den kolorektalen Adenomen, was unsere Beobachtung unterstützt, dass die CCR6-Expression in differenzierten Gewebe höher ist (Abb. 24).

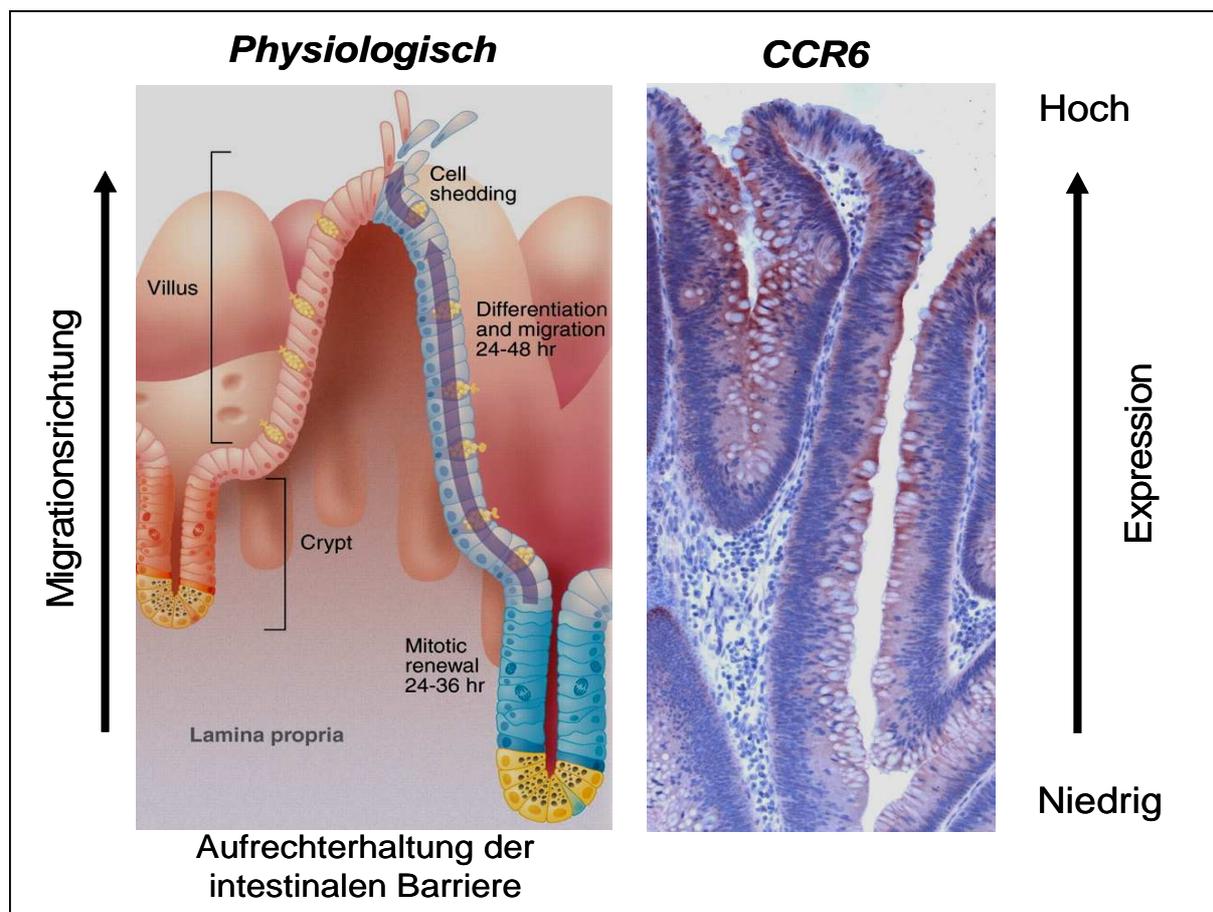


Abbildung 24: Die CCR6-Expression nimmt entlang der Kryptenachse zu mit einer niedrigen Expressionsrate an den Basen der Krypten gegenüber einer hohen Expressionsrate in den mehr differenzierten apikalen Zellen.

Diese Beobachtung, dass CCR6 einen Marker für normale IEC-Differenzierung darstellt, wird ebenfalls durch eine kürzlich durchgeführte komplexe Genanalyse von Markern der Differenzierung in Keratinozyten und IEC unterstützt, die CCR6 vor allem in höher differenzierten Zellen zeigen konnte ²⁵. Basierend auf der IEC-Migration, die, wie hier herausgefunden wurde, u.a. durch CCL20 vermittelt wird, ist dieser CCR6-Gradient innerhalb der intestinalen Krypten vermutlich ein entscheidender Faktor, der direkt in der IEC-Bewegung während der Zelldifferenzierung von den Kryptenbasen zu den apikalen Anteilen involviert ist.

Eine Vielzahl von Studien wies nach, dass die CED, wie die Colitis ulcerosa und der M. Crohn, einen Risikofaktor für die Entstehung von CRC darstellen ^{20,40,50,75}. Das CRC ist charakterisiert durch die Metastasierung in abdominale Lymphknoten und in die Leber. Die Tumormetastasierung ist dabei von hoher klinischer Relevanz, da Patienten mit einem CRC im fortgeschrittenen metastasierten Stadium selten länger als fünf Jahre leben ¹². In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CRC-Zellen den funktionellen CCR6-Chemokin-Rezeptor exprimieren, der ebenfalls in allen primären CRC-Zellen entdeckt und in allen Metastasen analysiert wurde. Die Leber ist dabei der Hauptproduzent für CCL20 ⁵⁷, weshalb sehr wahrscheinlich die Lebermetastasierung der CCR6-exprimierenden kolorektalen Karzinomzellen durch dieses Chemokin-System vermittelt wird. Diese Hypothese wird durch eine kürzlich veröffentlichte Studie unterstützt, die zeigen konnte, dass der Chemokin-Rezeptor CCR6 in Lebermetastasen von Kolon-, Schilddrüsen- und Ovarialkarzinomen im Vergleich zu normalen Lebergewebe überexprimiert ist ²⁹. Allerdings konnten wir zeigen, dass in entdifferenzierten Tumoren die CCR6-, aber auch die CCL20-Expression abnimmt (Tabelle 9), was ebenfalls dafür spricht, dass CCR6 ein Marker der Zelldifferenzierung ist.

Eine Stimulierung der CRC-Zellen mit dem CCR6-Liganden CCL20 triggerte aber Antworten, die ähnlich zu denen sind, die Leukozyten gegenüber chemoattraktiven Molekülen zeigen, wie z.B. die CRC-Migration. Diese Ergebnisse zeigen auf, dass CCR6 eine Rolle bei der CRC-Zellmigration und –Metastasierung spielt, was wiederum durch eine erst vor kurzem publizierte Studie unterstützt wird ¹⁶². Dort konnte nämlich nachgewiesen werden, dass eine apikale Stimulierung mit CCL20 von polarisierten CCR6-exprimierenden CRC in einer Tyrosin-Phosphorylierung des p130 Crk-assoziierten Substrates (Cas) resultiert, was ein Adapter- und

Gerüstprotein darstellt, welches fokale Adhäsion vermittelt und eine Rolle bei der Regulierung der zytoskelettalen Elemente spielt, die wiederum wichtig für den Zellanbau und die Zellmigration sind. Neben der Tatsache, dass CCL20 von normalen IEC exprimiert wird und wahrscheinlich auch die Invasion und Migration von Karzinomzellen in das intestinale Epithel vermittelt, wurden zusätzlich zu dem CRC auch in mehreren anderen Karzinomen funktionale CCR6-Rezeptoren entdeckt, wie z.B. im Pankreas-Karzinom^{18,79,80}, im hepatozellulären Karzinom⁴⁴, im multiplem Myelom⁹⁵ und in bestimmten B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen¹²¹, was auf ähnliche Mechanismen der Tumorzellmigration und –metastasierung in der Vielfalt der Karzinome schließen lässt.

4.2 Einfluss der CCL20/CCR6-vermittelten Signaltransduktion

Die Stimulation von IEC mit den proinflammatorischen Zytokinen LPS, TNF- α und IL-1 β führte in dieser Arbeit zu einer erhöhten CCL20-mRNA-Expression. Dies und die Tatsache, dass CCL20 zusätzlich zu den proinflammatorischen Stimuli seine eigene mRNA-Expression in IEC steigert, deutet auf eine wichtige Funktion von CCL20 bei entzündlichen Prozessen hin. Ein ähnlicher Effekt konnte bereits für das Chemokin ENA-78/CXCL5 nachgewiesen werden¹³².

Durch die Bindung extrazellulärer Liganden, wie z.B. Zytokine, an spezifische Rezeptoren kommt es zu Änderungen der Transkription innerhalb des Zellkerns, wobei MAP-Kinasen (MAPK) ein wichtiges Signaltransduktionselement darstellen. MAPK gehören zur Gruppe der Serin- und Threonin-Proteinkinasen, die Komponenten eines ubiquitär vorkommenden Signaltransduktionsnetzes sind, das durch eine Vielzahl von verschiedenen Stimuli wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Hormone und Stressoren aktiviert wird¹²⁶. Bis heute wurden drei wichtige MAPK-Untergruppen charakterisiert: ERK-1/2, SAPK/JNK und p38. Die Aktivität der MAPK ist durch duale Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Threonin und Tyrosin der MAP-Kinasen-Kinasen (MAPKK) bzw. Proteinphosphatasen reguliert. Die MAPKK werden, vermittelt durch MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen (MAPKKK), durch Phosphorylierung aktiviert. Stress-aktivierte MAPK-Signalaktivierungskaskaden können durch die sequentiellen Wirkungen der MAPKKK, MAPKK und MAPK gebildet werden¹²⁶. Inaktivierungen der Proteinkinasen werden durch Phosphatasen, wie Ser-Phosphatasen, Tyr-Phosphatasen und duale spezifische Phosphatasen, reguliert. MAPK-

Phosphorylierungen haben einen wichtigen Einfluß auf das Zytoplasma, den Zellkern, das Zytoskelett und die Membranen. Sie sind beteiligt an der Regulation von Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose^{158,160} (Abbildung 25).

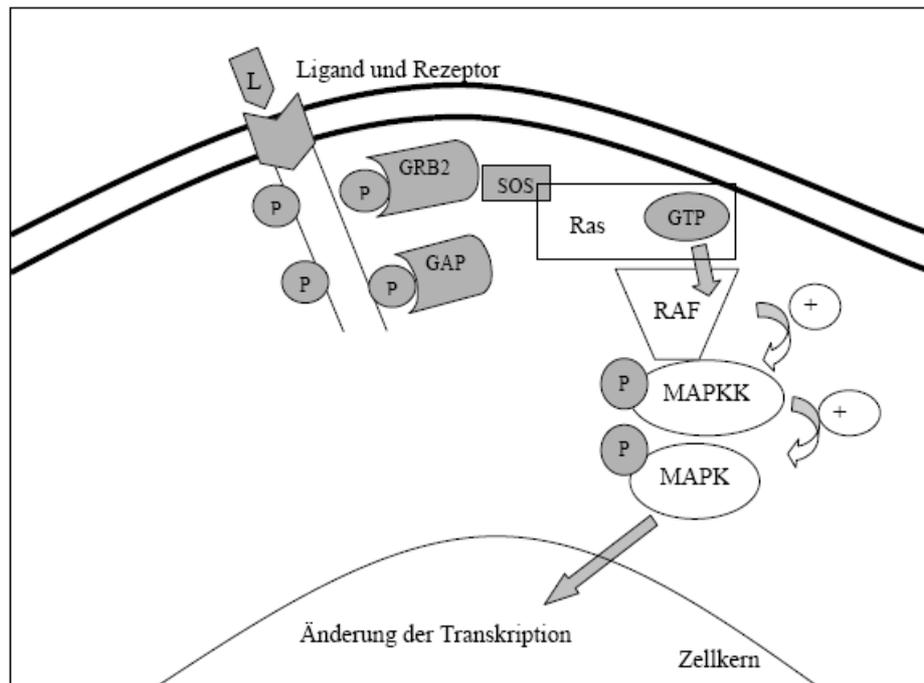


Abbildung 25: Die intrazelluläre MAPK-Aktivierungskaskade wird durch eine Phosphorylierungskaskade reguliert. Nach Bindung des Liganden (L) werden spezifische Threonin- und Tyrosinreste der jeweiligen Rezeptoren phosphoryliert und dienen dann als Bindungsstellen einer Reihe von Adapterproteine. Diese verfügen hierzu über eine sogenannte SH2-Domäne, die ursprünglich in der viralen src-Kinase entdeckt wurde. Für die Induktion der für die mitogenen Antwort verantwortlichen Gene ist dabei die MAPK von besonderer Bedeutung. Aktiviert wird Ras durch einen mehrstufigen Vorgang: das Adapterprotein bindet über eine SH2-Domäne an den aktivierten Rezeptor (Grb2) und bindet dann ein als SOS (Son of sevenless) bezeichnetes Protein, das an einem in die Membran integrierten Ras-Protein zu einem Austausch von GDP gegen GTP führt. GTP-Ras ist ein Aktivator einer als Raf bezeichneten Proteinkinase, die das erste Glied in einer Kaskade von Proteinkinasen darstellt. Nachfolgend werden MAPKK dual phosphoryliert.

Eine Stimulierung von IEC mit CCL20 resultiert in einer Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege. CCL20 aktiviert in erster Linie den MEK-ERK-MAPK Signaltransduktionsweg in IEC, der auch der übergeordnete Signalweg für andere Chemokin-Rezeptoren, wie zum Beispiel für CX3CR1¹¹ und CXCR4^{12,14,145} ist. Präinkubation mit dem MEK-Inhibitor PD98059 reduzierte die CCL20-induzierte Phosphorylierung von ERK-1/2, was darauf schließen lässt, dass diese Phosphorylierung MEK-1-abhängig ist.

Im Gegensatz zu den Analysen der CX3CR1-Signaltransduktionswege resultierte eine CCR6-Aktivierung auch in einer erhöhten Phosphorylierung von SAPK/JNK-

Kinasen, sowie in einer gesteigerten Akt-Phosphorylierungsrate¹¹. Analog hierzu durchgeführte Präinkubationen mit dem spezifischen MEK-1-Inhibitor PD98059 ergaben für SAPK/JNK ebenfalls eine MEK-1-Abhängigkeit. Eine Aktivierung für die MAPK p38 konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Hauptwege der Aktivierungskaskade von Entzündungen, und hier im speziellen bei M. Crohn, MEK-gesteuert sind. Interessanterweise zeigten vor kurzem zwei Studien dazu, dass beim M. Crohn die SAPK/JNK-Phosphorylierungsspiegel erhöht sind^{60,153}. Es wird angenommen, dass die Produktion von TNF- α , dem zentralen Entzündungsmediator bei CED, über JNK- und/oder p38-Signalwege reguliert wird⁶⁰. Eine Behandlung mit dem synthetischen Guanylhydrazon CNI-1493, welches sowohl SAPK/JNK als auch p38 inhibiert, führte zu signifikanten klinischen Besserungen mit einer schnelleren endoskopisch sichtbaren Heilung von Ulzera bei M. Crohn-Patienten⁶⁰. Somit könnte die Aktivierung von SAPK/JNK durch CCL20 in IEC auf eine proinflammatorische Wirkung dieses Zytokins hinweisen. Gleiches gilt für die Aktivierung des ERK-1/2-Signalweges, von dem lange angenommen wurde, dass er nur Zellwachstum und Zellproliferation reguliert. ERK-1/2-defiziente Mäuse sind phänotypisch normal und fertil, zeigen aber eine defekte Thymozytenumwandlung und eine reduzierte Expression der α - und β -Ketten von T-Zellen. Dies weist daraufhin, dass die ERK-Aktivierung wichtig für die T-Zellaktivierung und somit für die Immunantwort ist.

Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3-Kinasen) sind eine Gruppe von Enzymen, deren Aufgabe in der Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-Lipiden nach entsprechender Stimulation der Zelle besteht. Die entstehenden Mediatoren, z.B. Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns(3)P), Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat (PtdIns(3,4)P₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃), spielen u.a. eine bedeutende Rolle in der Regulation von Zellproliferation und Zellüberleben¹⁴⁶. Durch die PI-3-Kinasen und der nachgeschalteten Akt-Kinase, auch als Protein-Kinase B bezeichnet, werden zelluläre Entzündung, Chemotaxis und Apoptose gesteuert. Es gibt Hinweise, dass über den PI-3-Kinase/Akt-Signalweg in einer Art negativen Feedback-Mechanismus proinflammatorische und apoptotische Aktivitäten inhibiert werden. Beispielsweise wurde gezeigt, dass durch den PI-3-Kinase/Akt-Signalweg die Produktion proinflammatorischer Mediatoren in LPS-behandelten Monozyten reduziert war⁷. Ebenso war in PI-3-Kinasen-defizienten Mäusen die Anzahl gastrointestinaler Mastzellen vermindert und die antimikrobielle

Abwehr gestört, was auf eine wichtige Rolle dieses Signalwegs bei der Immunantwort hinweist¹⁶³. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CCL20 den Akt-Signalweg in IEC aktiviert. Somit könnte CCL20, durch Akt-vermittelte, vermehrte Zellregeneration und -proliferation bzw. antiinflammatorische Mechanismen, eine protektive Rolle im Gastrointestinaltrakt haben.

IL-8 gehört zur Gruppe der CXC-Chemokine. Als chemotaktisches Zytokin induziert es die Migration von Immunzellen zu Orten der Entzündung. Für IL-8 wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass dessen Sekretion in intestinalen Epithelzellen unter anderem durch Bakterien, LPS, diverse Zytokine und Phorbol ester erhöht war²⁶. Auch bei M. Crohn und Colitis ulcerosa wurde eine Bedeutung von IL-8 beschrieben^{77,94}. CCL20 führte in dieser Arbeit in IEC zu einer Hochregulation des proinflammatorischen Zielgenes IL-8. Diese Ergebnisse deuten ebenfalls auf eine wichtige Bedeutung von CCL20 bei entzündlichen Prozessen im Gastrointestinaltrakt hin.

4.3 Funktionen in intestinalen Epithelzellen

Eine Reihe von Studien zeigte, dass die Aktivierung von ERK-MAP-Kinasen und Akt mit einer erhöhten Zellmigration assoziiert ist^{52,137,163}. Beide Signalwege wurden in dieser Arbeit nach CCL20-Stimulation in IEC aktiviert. Ebenso wurde gezeigt, dass eine CCL20-vermittelte CCR6-Aktivierung zu einer erhöhten IEC-Migration führt und somit die Wundheilung fördert (Abb. 26). Zu bedenken ist dabei, dass eine gesteigerte Zellmigration ein wesentlicher Aspekt bei dem Wachstum maligner Tumoren und ihrer Metastasierung ist. Eine Verbindung zwischen der CCR6-Expression auf Tumorzellen und insbesondere der Lebermetastasierung wurde bereits beschrieben²⁹. Auf T-Zellen resultiert eine Interaktion zwischen CCR6 und seinem Liganden CCL20 in einer CD18-vermittelten Adhäsion an entzündliches Endothel. Eine Aktivierung von bisher unbekanntem Adhäsionsmolekülen während der Migration von metastatischen MOPC315-GFP-Zellen könnte dabei durch die CCL20/CCR6-vermittelte Interaktion entstehen, was ihre Bindung an das Endothel von Blutgefäßen in der Leber begünstigen würde. Dabei scheint allerdings eine wesentliche Rolle zu spielen, ob die MOPC315-Zellen auf ihrem Weg zur Leber Areale mit CCL20-Sekretion passieren²⁹. Das Überleben der Lebermikrometastasen ist dabei von Prozessen abhängig, die die genetische Progression und Selektion für den am besten wachsenden Phänotyp einschließen, da von einer anderen

Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass in einem vergleichbaren Tumormodell 99% der Mikrometastasen innerhalb kurzer Zeit nach der Kolonisation verschwanden⁹⁰. Dies lässt vermuten, dass mit der genetischen Progression einige Metastasen ihren originalen (CCR6-)Phänotyp verlieren.

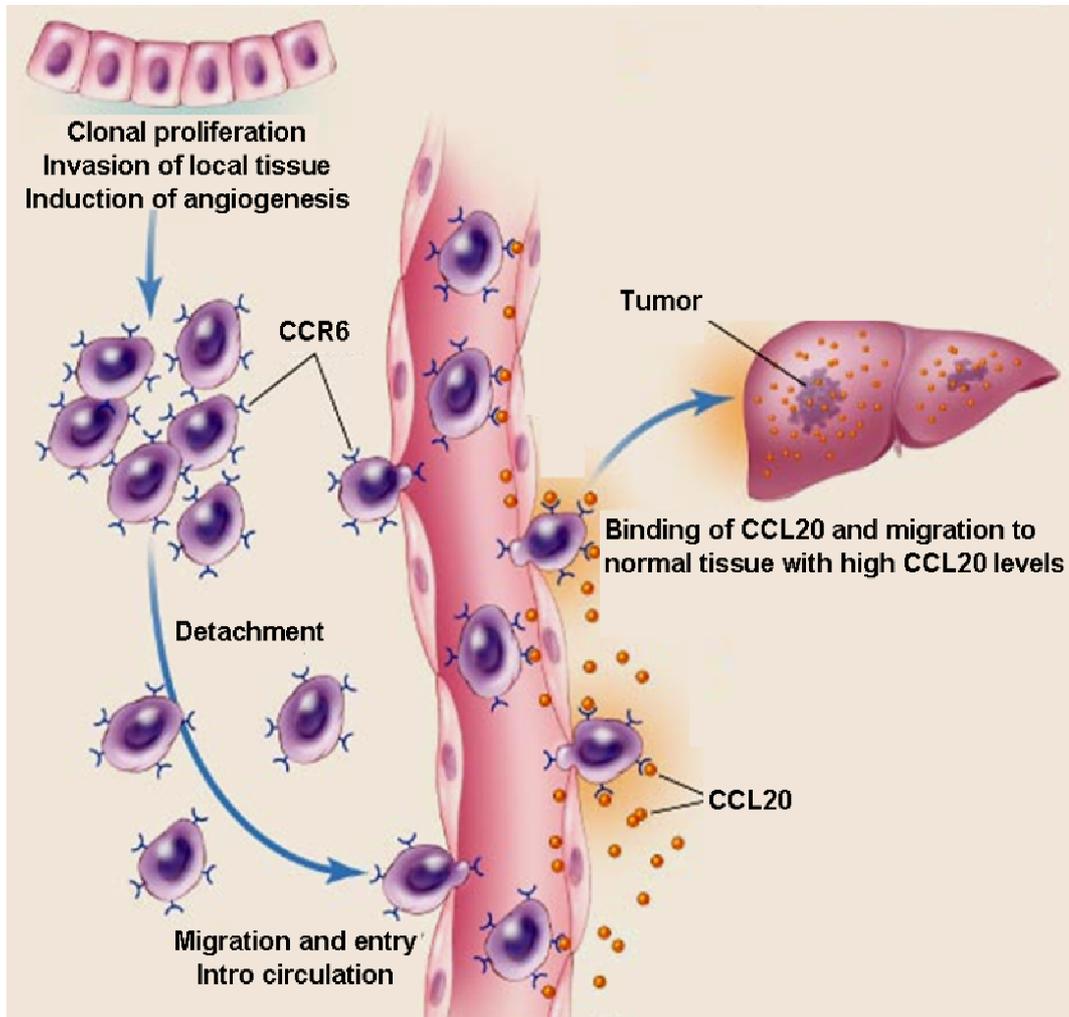


Abbildung 26: CCL20/CCR6-vermittelte Zellmigration zu Orten mit hohen CCL20-Expressionsspiegeln, wie z.B. der Leber (Originalabbildung modifiziert aus Ref. ¹⁶⁵).

Eine CCR6-induzierte IEC-Migration ist darüber hinaus auch während der normalen IEC-Entwicklung wichtig und natürlich auch unter entzündlichen Bedingungen, da intestinale Entzündungen wie CED durch eine gestörte intestinale Barrierefunktion gekennzeichnet sind und deren Heilung von einer ungestörten IEC-Migration abhängt. Wie in den Wounding-Assays dieser Arbeit bewiesen werden konnte, könnte die CCL20-Stimulierung die epitheliale Restitution erleichtern. Grundsätzlich wird beim gesunden Menschen eine zerstörte intestinale Schleimhautbarriere sehr schnell wieder regeneriert. Bei Patienten mit CED ist diese Barriere durch verschiedene Faktoren gestört.

Die CCL20- vermittelte Zellrestitution ist zum Teil durch eine erhöhte Zellproliferation bedingt, wobei interessanterweise nur geringe Konzentrationen von CCL20 (10 ng/ml bzw. 100 ng/ml) die Zellproliferation steigerten, hohe Konzentrationen (1000 ng/ml) hingegen die Zellproliferation verringerten. Diese umgekehrte U-Kurve wurde in ähnlicher Weise bei anderen zellmigrationsfördernden Zytokinen (z.B. bei dem Chemokin CXCL12) beobachtet ¹². Dennoch deuten diese Daten daraufhin, dass CCL20 bei der Restitution der intestinalen Barriere von Bedeutung ist (Abb. 26).

Neben der Zellproliferation ist auch die Apoptose ein wichtiger Mechanismus, durch den die intestinale Barriere und ihre Restitution, z.B. im Rahmen von CED, kontrolliert wird. Darüber hinaus wurde bereits eine gesteigerte Zellproliferation und eine verminderte Apoptose in kanzerogenem Gewebe gezeigt, was zu einem ausgedehnten Tumorwachstum und Resistenz gegen „apoptotische“ und antiproliferative Therapiestrategien führte ³⁹. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten allerdings für CCL20 in IEC keine Effekte auf die zelluläre Apoptose nachgewiesen werden. Auch für das Chemokin CXCL12 konnten wir keine Effekte auf die IEC-Apoptose zeigen ¹².

Intestinale Bakterien spielen bei der Entwicklung von CED, insbesondere bei Patienten mit entsprechender Suszeptibilität, eine herausragende Rolle ^{119,157}. Mutationen im CARD15/NOD2-Gen, das für die Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne 2 (NOD2) kodiert, haben beispielsweise bei M. Crohn-Patienten einen starken Befall des Ileums zur Folge ¹¹⁶. Das Protein ist ein intrazellulärer Rezeptor für Muramyl-dipeptid, das in der intestinalen Schleimhaut, und dort vor allem in den Paneth'schen Körnerzellen, exprimiert wird. In diesen Zellen kommt es nach der Bindung von bakteriellen Antigenen an den Rezeptor zur Produktion von antimikrobiellen Peptiden wie Lysozym, sekretorische Phospholipase A2 und Defensinen, die einen wesentlichen Teil der angeborenen Schleimhautimmunität darstellen ¹²⁸. Aufgrund ihrer Homologie und ihrer Verbindung von sechs Cystein-Resten, werden die humanen Defensine (hBD) in α - und β -Familien klassifiziert. β -Defensine bestehen dabei aus positiv geladenen Eiweißbausteinen und besitzen einen antibiotischen Effekt gegen Bakterien, Pilze und Viren ¹⁵⁹. Sie werden überwiegend in der Haut und in Schleimhautepithelzellen exprimiert, wo sie eine Barriere gegen mikrobielle Infektionen bilden ¹⁰⁵. Untersuchungen konnten zeigen, dass eine verminderte antimikrobielle Abwehr bei M. Crohn-Patienten mit Ileumbefall besteht, die durch eine reduzierte Expression von

α -Defensin in Paneth'schen Körnerzellen verursacht wird⁸³. Die verminderte Expression der Defensine, vor allem hBD-5 und hBD-6, war bei Patienten mit der CARD15/NOD2-Mutation am stärksten ausgeprägt¹³¹. Vor kurzem wurde bei Patienten mit M. Crohn eine verringerte β -Defensin-Genkopiezahl beschrieben, von der normalerweise vier Kopien auf Chromosom 8 vorliegen. Diese Verringerung der Kopiezahl war mit einem erniedrigten β -Defensinspiegel und daraus resultierend mit einer reduzierten antibakteriellen Aktivität assoziiert⁴¹. Andere Untersuchungen konnten belegen, dass vor allem β -hBD-2 und nicht β -hBD-1 in entzündeten Läsionen von Patienten mit CED hochreguliert ist¹⁵⁷. Da nun hBD-2 ebenfalls an den Rezeptor CCR6 binden und diesen auch aktivieren kann, könnten sich hierfür protektive Eigenschaften bei CED durch Schutz der intestinalen Barriere ergeben.

4.4 Funktionen in anderen Zellpopulationen

Die Infiltration mit T-Zellen ist ein typisches histopathologisches Kennzeichen bei CED¹⁷. Bis vor kurzem wurde angenommen, dass M. Crohn eine TH1-vermittelte und Colitis ulcerosa eine TH2-vermittelte Immunreaktion darstellt^{85,94,109}. Unter Verwendung von Chemokin-Rezeptoren als Marker für differenzierte CD4⁺-T-Zellen konnten erst kürzlich zwei Untergruppen von humanen IL-17 produzierenden TH17-Gedächtniszellen identifiziert werden. TH17-Zellen selbst entstehen durch Differenzierung von CD4⁺-Effektorzellen, wobei hierfür TGF- β und IL-6 verantwortlich sind¹⁰². Dabei sind CCR6 und CCR4 auf TH17-Zellen exprimiert, die IL-17, aber nicht IFN- γ produzieren, während CCR6- und CXCR3-Expression sowohl für eine größere Fraktion von TH1-Zellen, als auch für eine kleine Population von Zellen, die sowohl IL-17, als auch IFN- γ produzieren, charakteristisch ist (Abb. 27)². Die Produktion von IL-17 war nach einer T-Zell-abhängigen und T-Zell-unabhängigen in vitro Population stabil, was zeigt, dass humane TH17-Zellen, wie TH1- und TH2-Zellen, ein Gedächtnis ausbilden. Das Fortbestehen bzw. Überleben der TH17-Zellen wird vor allem durch IL-23 gewährleistet¹⁰². Auf TH17-Zellen ist der IL-23-Rezeptor exprimiert¹⁰², wobei vor kurzem in einer Studie ein bestimmter Polymorphismus dieses Rezeptors (R381Q) mit einer Protektion vor M. Crohn assoziiert wurde³⁴. Dies konnte auch in unserer M. Crohn-Population bestätigt werden (Eigene unpublizierte Daten). Neue Studien bieten eine funktionelle Verbindung zwischen CCR6 und IL-17 an, die mit entsprechender Gewebepathologie assoziiert ist. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass CCR6 bei der Rekrutierung von

pathogenen T-Zellen bei der Enzephalitis⁸², Rheumatoiden Arthritis¹²⁵ und Psoriasis⁵⁹ involviert ist, und dass TH17-Zellen als essentielle Mediatoren dieser Erkrankungen erkannt wurden⁹⁹. Aber nicht nur für den CCR6-Liganden CCL20, der in diversen IEC-Linien exprimiert wird, konnte nachgewiesen, dass er durch IL-17 hochreguliert wird, sondern auch für den CCR6-Agonisten β -Defensin⁷². Gleiche IL-17-vermittelte Effekte wurden für die CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 nachgewiesen⁷⁸ (Abb. 27).

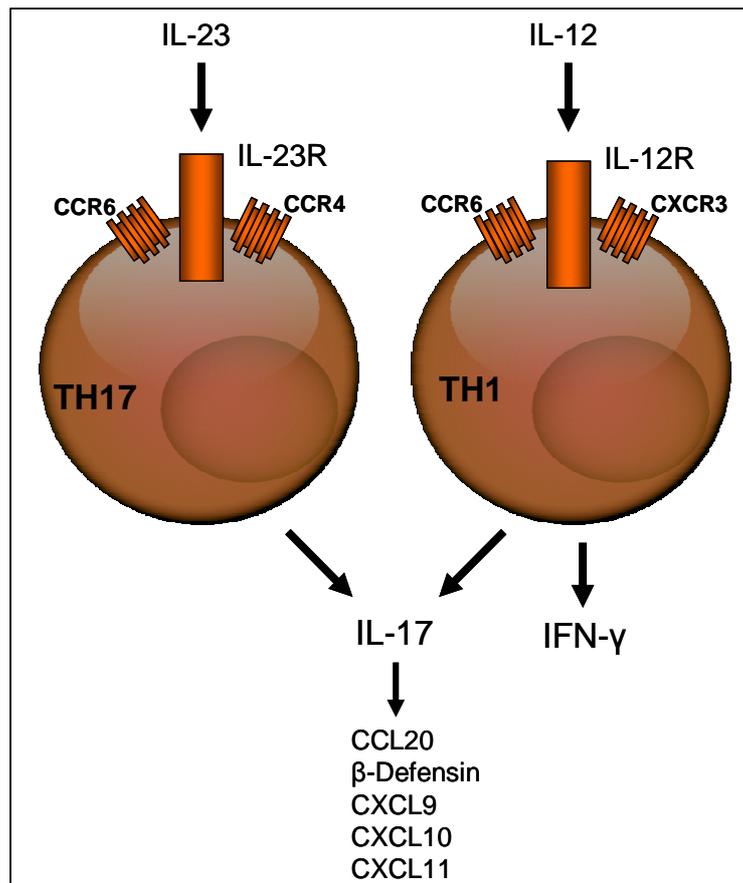


Abbildung 27: TH1- und TH17-Zellen vermitteln über IL-17 einen Anstieg der Chemokine CCL20, β -Defensin, CXCL9, CXCL10 und CXCL11 (Originalabbildung modifiziert nach Ref.¹⁰²)

Die neuen Erkenntnisse zu den TH17-Zellen könnten zu einem Umdenken bzgl. der Pathogenese von CED führen und weisen auf eine wichtige Bedeutung von CCL20 bei CED hin. Bis jetzt wurde angenommen, dass vor allem der IL-12-Signalweg eine zentrale Bedeutung bei der Entwicklung der intestinalen Entzündung durch Aktivierung von TH1-Zellen einnimmt. Jedoch scheinen TH17-Zellen eine ebenso wichtige Rolle zu spielen.

Ein charakteristisches Merkmal der CED, insbesondere des M. Crohn, ist die Anwesenheit von aktivierten CD4⁺-T-Zellen. Erst vor kurzem konnte gezeigt werden,

dass die CCL20-Produktion, einem CD4-T-Zell-gerichteten Chemokin, von Kolonepithelzellen im Rahmen von CED erhöht ist ⁷⁴. Ein Charakteristikum aller Chemokine ist dabei die „Chemoattraktion“, d.h. die gerichtete Migration von Immunzellen mit entsprechendem Chemokin-Rezeptor. Dabei besitzen unterschiedliche Chemokine auch unterschiedliche Immunzell-Wirkprofile. In in vitro Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass beispielsweise Fractalkin ähnlich wie andere proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-1 β) seine eigene Gentranskription via NF- κ B regulieren kann ¹⁰. Dies könnte zu einer Verstärkung einer bestehenden Entzündungsreaktion aber auch zu einer verstärkten Chemoattraktion von Abwehrzellen führen. In einem Maus-Modell zeigte sich erst kürzlich, dass in einer TNBS-induzierten Colitis die CCL20-Protein-Spiegel in Balb/c-Mäusen ansteigen. Zugleich konnte eine steigende Zahl von CCR6-exprimierenden CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen der Lamina propria in den TNBS-behandelten Mäusen nachgewiesen werden ⁷⁴. Eine Behandlung der Mäuse mit einem anti-CCL20 monoklonalen Antikörper reduzierte die TNBS-vermittelte Colitis deutlich, was zeigt, dass eine Blockade der CCL20-Bioaktivität Einfluss auf die Pathophysiologie bei CED hat ⁷⁴. Die T-Zell-Aktivierung mittels DC ist entscheidend für die Einleitung von Immunantworten und für die Protektion gegen pathogene Bakterien (Abb. 28).

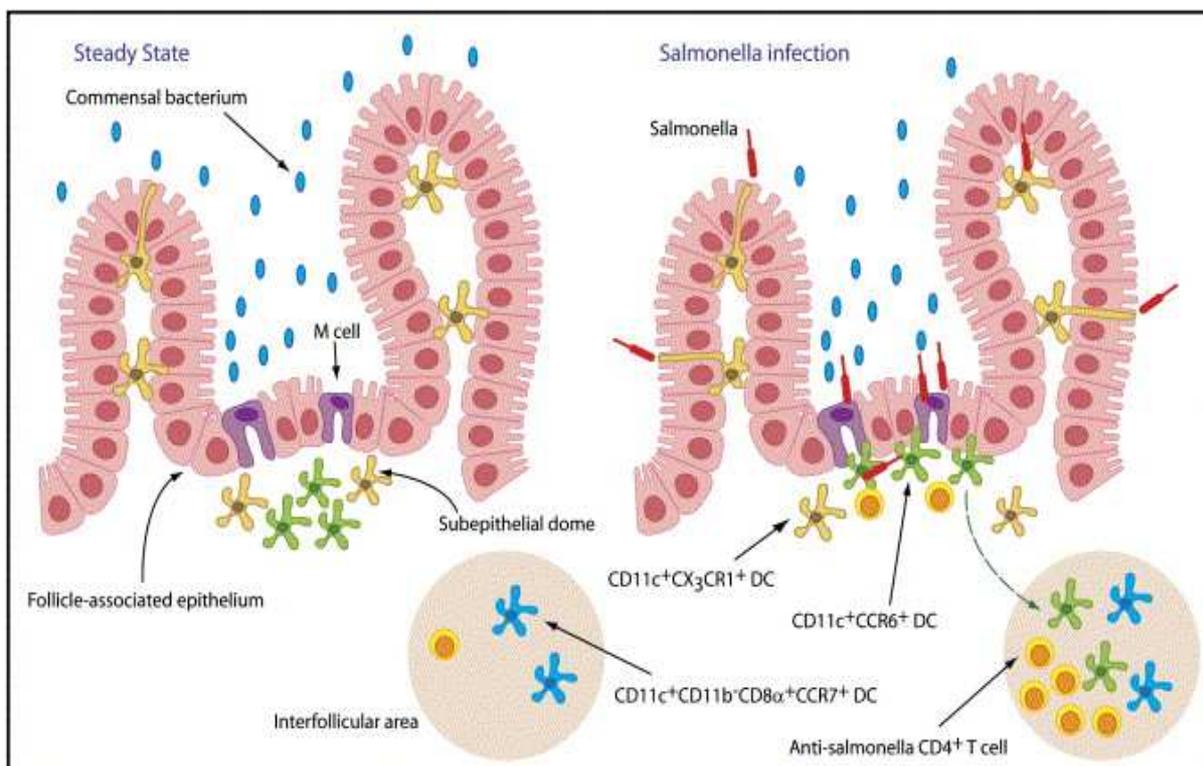


Abbildung 28: CCR6⁺/CD11c⁺ und CX3CR1⁺/CD11c⁺ DC sind funktionelle Bestandteile in den Peyer'schen Plaques. Im Zustand des „steady-state“ (links) tasten die CX3CR1⁺ DC das lumenale Intestinum, entweder direkt mittels dendritischer Fortsätze, oder indirekt nach der Antigen-Transcytose

durch die M-Zellen des Follikel-assoziierten Epithels (FAE) der Peyer'schen Plaques, ab. CCR6⁺ DC sind lediglich in den subepithelialen Domarealen der Peyer'schen Plaques zu finden und nicht in der Lamina propria der intestinalen Villi. Nach einer Salmonella-Infektion (rechts) werden CCR6⁺ DC zum FAE der Peyer'schen Plaques rekrutiert, allerdings nicht in die Lamina propria. Dort werden die CCR6⁺ DC zur schnellen T-Zell-Aktivierung benötigt. In dem FAE konnten Cluster von CCR6⁺ DC mit Salmonella-spezifischen T-Zellen gefunden werden. Ob dies nun zur T-Zell-Aktivierung beiträgt, oder ob die CCR6⁺ DC dazu in die interfollikuläre T-Zell-Region wandern müssen, bleibt allerdings noch offen (Originalabbildung aus Ref. ¹²⁵).

Die schnelle Aktivierung von spezifischen T-Zellen wird dabei über spezialisierte DC in Peyer'schen Plaques vermittelt. Diese Gruppe von DC, die ausschließlich in den Peyer'schen Plaques gefunden wurde, ist durch die Expression des Chemokin-Rezeptors CCR6 charakterisiert ¹²⁵. Die CCR6⁺-DC werden dazu in den Domregionen der Peyer'schen Plaques durch enterische Pathogene angezogen und sind somit für die schnelle lokale Aktivierung der Pathogen-spezifischen T-Zellen verantwortlich ¹⁰⁴. CCR6-defiziente DC waren nicht imstande, diese Effekte zu imitieren, was zeigt, dass eine CCR6-abhängige Regulation der DC verantwortlich für die lokalisierte T-Zell-abhängige Abwehr gegen entero-invasive Pathogene (wie z.B. Salmonellen) ist ¹²⁵. Somit spielt CCR6 und sein Ligand eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der Immunantwort.

5. Klinische Bedeutung und Ausblick

Chemokine und Chemokin-Rezeptoren als therapeutischer Angriffspunkt

Aufgrund ihrer vielfältigen Wirkung bei entzündlichen Prozessen bieten sich Chemokine und ihre Rezeptoren als Zielstruktur für therapeutische Interventionen an. Verschiedene Chemokin- und Chemokin-Rezeptor-Antagonisten wie neutralisierende Antikörper sowie Peptidyl- und Non-Peptidylantagonisten wurden entwickelt⁶³. Aufgrund der relativ großen Redundanz innerhalb bestimmter proinflammatorischer Chemokine erscheint eine Neutralisation auf Rezeptor-Ebene effektiver als die Hemmung einzelner Chemokine, obwohl in Tiermodellen die Effektivität neutralisierender Antikörper gegen bestimmte Chemokine geprüft werden konnte. So verringerte z.B. ein neutralisierender Antikörper gegen IL-8 Lungen-Reperfusionsschäden in Kaninchen¹³⁶.

Durch Aminosäure-Deletion oder Modifikation der N-terminalen Region von Chemokinen wurden Peptid-Chemokin-Analoga synthetisiert, die an Chemokin-Rezeptoren binden aber keine Signaltransduktion initiieren und daher antagonistisch wirken^{87,138}. Non-Peptid-Chemokin-Rezeptor-Antagonisten wurden ebenfalls beschrieben. Besonderes Interesse haben CXCR4-Antagonisten, da für CXCR4 eine wesentliche Funktion als HIV-Corezeptor nachgewiesen werden konnte²⁶. CXCR4-Antisense-Oligonukleotide⁸⁴ und das Peptid T22⁹⁸ zeigen CXCR4-antagonistische Eigenschaften. Sogenannte Non-Peptide („small molecule“)-Inhibitoren werden gegenwärtig in Phase I-Studien bezüglich ihrer Wirksamkeit bei bestimmten Chemokin-vermittelten Erkrankungen getestet, obwohl dazu bisher noch keine Daten veröffentlicht wurden. Diese Antagonisten sind derzeit zur Testung der therapeutischen Effekte von Chemokin-Ligand-Rezeptor-Antagonisten in verschiedenen CED-Modellen verfügbar. In Kombination mit Knock-out-Mausmodellen lassen sich durch diese Modelle Chemokin-Ligand-Rezeptor-Systeme mit zentraler Bedeutung bei CED nachweisen, die mit entsprechenden Antagonisten therapiert werden könnten⁹. Zurzeit steht noch kein CCR6-Antagonist zur Verfügung, mit dem sich aber nach den Ergebnissen dieser Arbeit eine Vielzahl von therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten ergeben würde.

Zusätzlich scheinen bestimmte Chemokine, wie bereits in der Einleitung erwähnt, eine begrenzte Antitumorwirkung zu zeigen. Kombinationstherapien aus einem Chemokin und einem bestimmten Zytokin stellen somit aufgrund ihrer stimulierenden Eigenschaften neue Therapieoptionen in der Antitumor-Immuntherapie dar.

6. Zusammenfassung

Die Expression von CCL20 (MIP-3 α), das chemoattraktiv auf Leukozyten wirkt und deren Migration zu entzündlich veränderten Arealen vermittelt, wurde in intestinalen Epithelzellen gezeigt. Ziel dieser Studie war es, die Rolle des CCL20-Rezeptors CCR6 in intestinalen Epithelzellen und kolorektalen Karzinomzellen zu analysieren. Die Expression von CCR6 und CCL20 wurde mit Hilfe von RT-PCR und immunhistochemischen Färbungen analysiert. Die CCL20-vermittelten Signaltransduktionswege wurden mit Western-Blots, die Proliferation mit MTS-Assays und die Zellmigration durch Wounding-Assays untersucht. Die Effekte von CCL20 auf die Fas-induzierte Apoptose wurden mit der Durchflusszytometrie bestimmt.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass der Chemokinrezeptor CCR6 nicht nur auf hämatopoetischen Zellen (wie z.B. unreifen dendritischen Zellen), sondern auch von intestinalen Epithelzellen exprimiert wird. Zudem konnten wir auch eine Expression des CCR6-Liganden CCL20 (MIP-3 α) in diesen Zellen nachweisen, so dass von einer autokrinen Regulation dieses Chemokinsystems auszugehen ist. Darüber hinaus exprimierten kolorektale Karzinome und deren Metastasen den Rezeptor CCR6, der auch während der intestinalen Epithelzell-Differenzierung erhöht war. Diese Resultate korrelierten sehr gut mit den immunhistochemischen Analysen, in denen die höchste CCR6-Expression in den differenzierten apikalen Epithelzellen zu finden war, während basale Kryptepithelzellen eine nur geringe CCR6-Expression aufwiesen. Während CCR6 in differenzierten Karzinomen nachweisbar war, kam es mit zunehmender Entdifferenzierung in Tumormetastasen z.T. zum CCR6-Expressionsverlust.

Die Stimulation von intestinalen Epithelzellen mit CCL20 und proinflammatorischen Stimuli (TNF- α , IL-1 β , LPS) steigerte signifikant die CCL20-mRNA-Expression. Die CCL20-Expression war zudem signifikant in entzündeten Kolonbiopsie-Gewebe von M. Crohn-Patienten gesteigert und korrelierte außerdem signifikant mit der IL-8-mRNA-Expression in diesen Gewebeproben ($r=0.71$).

Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass der intestinal exprimierte CCR6-Rezeptor funktionell aktiv ist. CCL20 aktivierte die Signaltransduktionswege von ERK-1/2- und SAPK/JNK-MAP-Kinasen und erhöhte die IL-8-Proteinexpression. Die CCL20-vermittelte Aktivierung dieser Signalwege resultierte in einer 2,6-fach erhöhten Zellmigration ($p=0,001$) und in einer signifikanten Zunahme der

Zellproliferation ($p < 0,05$). Die Fas-induzierte Apoptose wurde dabei aber nicht beeinflusst.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse kann man annehmen, dass die CCR6-vermittelten Signale eine gesteigerte intestinale Epithelzell-Migration und -Proliferation ergeben und diese eine wichtige Rolle bei der intestinalen Homöostase zur strukturellen Aufrechterhaltung der Barriere spielen. Darüber hinaus hat das CCR6/CCL20-Chemokin-Ligand-Rezeptor-System aber auch bei Erkrankungen, wie der CED und dem CRC, wesentlichen Einfluss: einerseits durch die Vermittlung der Chemotaxis von intestinalen Epithelzellen bei der Wiederherstellung des intestinalen Epithels, andererseits bei der Vermittlung der Migration von kolorektalen Karzinomzellen. Die wesentlichen Experimente der hier vorgelegten Arbeit sind in der Übersicht (Abb. 29) zusammengefasst.

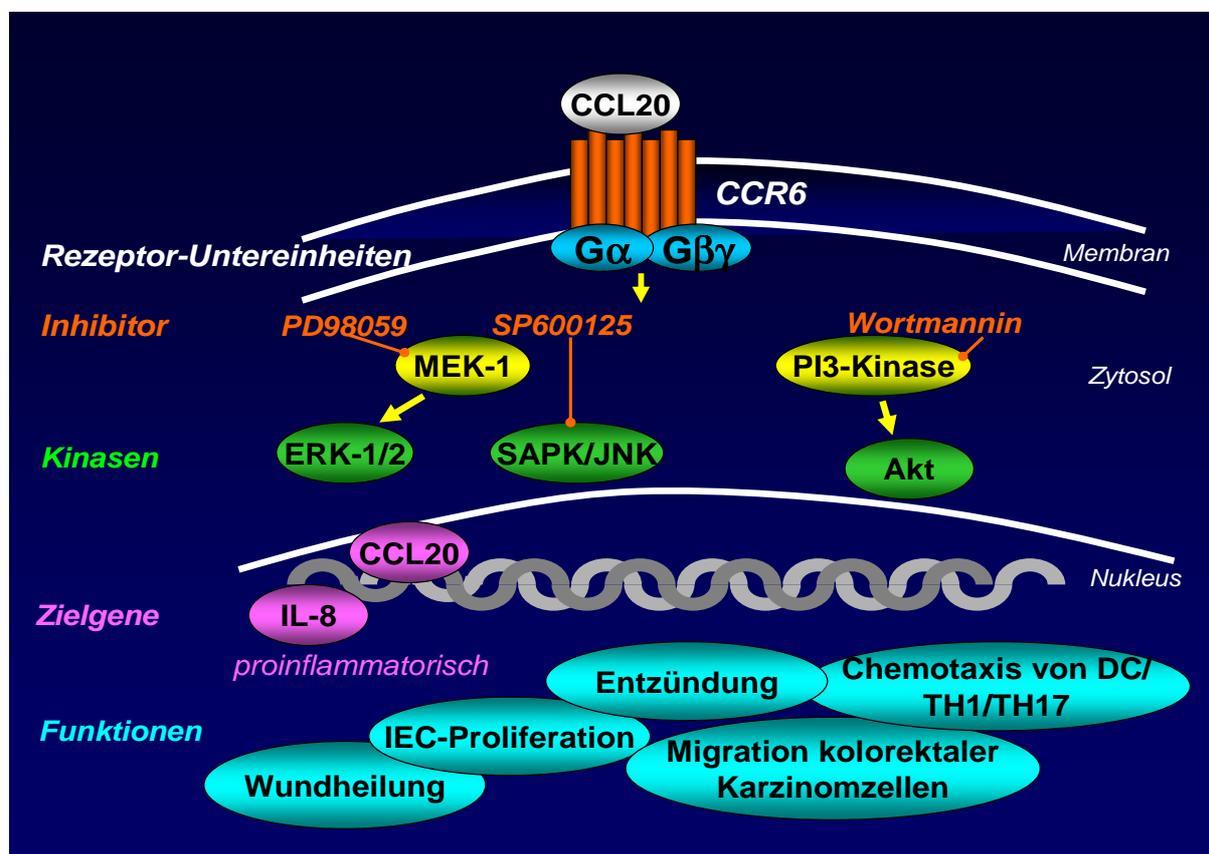


Abbildung 29: Übersicht über alle durchgeführten Experimente. Das Chemokin CCL20 und sein Rezeptor CCR6 werden sowohl von intestinalen Epithelzellen in normalen Geweben, als auch im kolorektalen Karzinom und in Metastasen exprimiert. Nach der Rezeptor-Aktivierung erhöht CCL20 die ERK-1/2-, JNK- und Akt-Phosphorylierung, was zu einer gesteigerten Expression von proinflammatorischen Genen und einer gesteigerten intestinalen Epithelzell-Proliferation und Wundheilung führt. Diese Mechanismen sind wichtig bei der Restitution von entzündetem intestinale Gewebe, aber ebenso wichtig bei der Migration und Metastasierung von kolorektalen Karzinomzellen. Darüber hinaus führt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine erhöhte CCL20-Expression während der Entzündung zu einer gesteigerten Chemotaxis von unreifen dendritischen Zellen, TH1- und TH17-Zellen in das intestinale Epithel^{2,126,128}.

7. Literaturverzeichnis

1. Abreu MT, Palladino AA, Arnold ET, Kwon RS, McRoberts JA. Modulation of barrier function during Fas mediated apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2000; 119:1524-1536.
2. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007; 8:639-646.
3. Agace WW, Amara A, Roberts AI, Pablos JL, Thelen S, Uguccioni M, Li XY, Marsal J, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Ebert EC, Moser B, Parker CM. Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr Biol* 2000; 10:325-328.
4. Andres PG, Beck PL, Mizoguchi E, Mizoguchi A, Bhan AK, Dawson T, Kuziel WA, Maeda N, MacDermott RP, Podolsky DK, Reinecker HC. Mice with a selective deletion of the CC chemokine receptors 5 or 2 are protected from dextran sodium sulfate-mediated colitis: lack of CC chemokine receptor 5 expression results in a NK1.1+ lymphocyte-associated Th2-type immune response in the intestine. *J Immunol* 2000; 164:6303-6312.
5. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392:565–568.
6. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997; 385:640-644.
7. Bonacchi A, Romagnani P, Romanelli RG, Efsen E, Annunziato F, Lasagni L, Francalanci M, Serio M, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P, Marra F. Signaltransduction by the chemokine receptor CXCR3: Activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/ controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem* 2001; 276:9945-9954.
8. Brand S. Advances in the understanding of the pathogenesis of IBD. 5th Symposium of Intestinal Bowel Disease, Munich January 25-27, 2007, Congress Proceedings.
9. Brand S, Reinecker HC. Novel chemokine ligand-receptor targets for the treatment of intestinal inflammation. Helicobacter meets inflammatory bowel disease 2000. International workshop on mucosal inflammation and cytokines. Tokyo: *Springer* 2001.
10. Brand S, Sakaguchi T, Gu X, Colgan SP, Reinecker HC. Fractalkine-mediated signals regulate cell-survival and immune-modulatory responses in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2002; 122:166-177.

11. Brand, S., Sakaguchi, T., Gu, X., Reinecker HC. Expression of a novel Chemokine ligand-receptor pair in intestinalepithelial cells: CXCL16 induced signals regulate epithelial restitution. (Als Vortrag zur Digestive Disease Week 2002 in San Francisco angenommen, Publikation als Abstract) *Gastroenterology* 2002; 122:4.
12. Brand S, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Diebold J, Otte JM, Göke B, Eichhorst ST. CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9-activation. *Exp Cell Res* 2005; 310:117-130.
13. Brand S, Olszak T , Beigel F, Diebold J, Otte JM, Göke B, Eichhorst ST, Dambacher J. Cell differentiation dependent expressed CCR6 mediates ERK-1/2, SAPK/JNK and signaling resulting in proliferation and migration of colorectal cancer cells. *J Cell Biochem* 2006; 97:709-723.
14. Brand S, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Diebold J, Otte JM, Göke B, Eichhorst ST. CXCR4 mediated signals regulate migration and invasion of colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 2005; 128:A478.
15. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CCR6 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* 1999; 94:3658-3667.
16. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981; 112:195-203.
17. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; 272:60-66
18. Campbell AS, Albo D, Kimsey TF, White SL, Wang TN. Macrophage inflammatory protein-3alpha promotes pancreatic cancer cell invasion. *J Surg Res* 2005; 123:96-101.
19. Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, de Bouteiller O, Dieu-Nosjean MC, Homey B, Massacrier C, Vanbervliet B, Zlotnik A, Vicari A. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin Immunopathol* 2000; 22:345-369.
20. Choi PM, Zelig MP. Similarity of colorectal cancer in Crohn's disease and ulcerative colitis: Implications for carcinogenesis and prevention. *Gut* 1994; 35:950-954.
21. Chung YS, Song IS, Erickson RH, Sleisenger MH, Kim YS. Effect of growth and sodium butyrate on brush border membrane-associated hydrolases in human colorectal cancer cell lines. *Cancer Res* 1985; 45:2976-2982.

22. Classen M., Diehl V., Kochsiek K. Innere Medizin, 4.Auflage. Urban & Schwarzenberg 2001; ISBN:3-54111674-9.
23. Corcione A, Ottonello L, Tortolina G, Facchetti P, Airoidi I, Guglielmino R, Dadati P, Truini M, Sozzani S, Dallegri F, Pistoia V. Stromal cell-derived factor-1 as a chemoattractant for follicular center lymphoma B cells. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:628-635.
24. Cook DN, Prosser DM, Forster R, Zhang J, Kuklin NA, Abbondanzo SJ, Niu XD, Chen SC, Manfra DJ, Wiekowski MT, Sullivan LM, Smith SR, Greenberg HB, Narula SK, Lipp M, Lira SA. CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity* 2000; 12:495-503.
25. Dabelsteen, S., J. T. Troelsen, and J. Olsen. Identification of keratinocyte proteins that mark subsets of cells in the epidermal stratum basale: comparisons with the intestinal epithelium. *Oncol Res* 2003; 13:393-398.
26. Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Scholmerich J, Gross V. Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38:216-222.
27. Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, Zeira E, Pal B, Karplus R, Beider K, Avniel S, Kasem S, Galun E, Peled A. Role of high expression levels of CCR6 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB J* 2004.
28. De Jager PL, Franchimont D, Waliszewska A, Bitton A, Cohen A, Langelier D, Belaiche J, Vermeire S, Farwell L, Goris A, Libioulle C, Jani N, Dassopoulos T, Bromfield GP, Dubois B, Cho JH, Brant SR, Duerr RH, Yang H, Rotter JI, Silverberg MS, Steinhart AH, Daly MJ, Podolsky DK, Louis E, Hafler DA, Rioux JD. The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun* 2007; May 31; [Epub ahead of print]
29. Dellacasagrande J, Schreurs OJ, Hofgaard PO, Omholt H, Steinsvoll S, Schenck K, Bogen B, Dembic Z. Liver metastasis of cancer facilitated by chemokine receptor CCR6. *Scand J Immunol* 2003; 57:534-544.
30. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996; 381:661-666.
31. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998; 188:373-386.
32. Dieu-Nosjean MC, Vicari A, Lebecque S, Caux C. Regulation of dendritic cell trafficking: A process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol* 1999; 66:252-262.

33. Dieu-Nosjean MC, Massacrier C, Homey B, Vanbervliet B, Pin JJ, Vicari A, Lebecque S, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Zlotnik A, Caux C. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med* 2000; 192:705-718.
34. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006; 314:1461-1463.
35. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase. *Science* 1997; 275:661-665.
36. Dwinell MB, Eckmann L, Leopard JD, Varki NM, Kagnoff MF. Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 1999; 117:359-367.
37. Dwinell MB., Johanesen PA, Smith JM. Immunobiology of epithelial chemokines in the intestinal mucosa. *Surgery* 2003; 133:601-607.
38. Eckmann L, Smith JR, Housley MP, Dwinell MB, Kagnoff MF. Analysis by high density cDNA arrays of altered gene expression in human intestinal epithelial cells in response to infection with the invasive enteric bacteria Salmonella. *J Biol Chem* 2000; 275:14084-14094.
39. Eichhorst ST, Krammer PH. Derangement of apoptosis in cancer. *Lancet* 2001; 358:345-346.
40. Ekbohm A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 1990; 323:1228-1233.
41. Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevins CL, Reinisch W, Teml A, Schwab M, Lichter P, Radlwimmer B, Stange EF. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 2006; 79:439-448.
42. Fridell YW, Jin Y, Quilliam LA, Burchert A, McCloskey P, Spizz G, Varnum B, Der C, Liu ET. Differential activation of the Ras/extracellular-signal-regulated protein kinase pathway is responsible for the biological consequences induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 1996; 16:135-145.
43. Fujiie S, Hieshima K, Izawa D, Nakayama T, Fujisawa R, Ohyanagi H, Yoshie O. Proinflammatory cytokines induce liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20 in mucosal epithelial cells through NF-kappaB. *Int Immunol* 2001; 13:1255-1263.

44. Fujii H, Itoh Y, Yamaguchi K, Yamauchi N, Harano Y, Nakajima T, Minami M, Okanoue T. Chemokine CCL20 enhances the growth of HuH7 cells via phosphorylation of p44/42 MAPK in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322:1052-1058.
45. Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, Newman W, Gropman JE. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* 1998; 273:23169-23175.
46. Ganju RK, Dutt P, Wu L, Newman W, Avraham H, Avraham S, Gropman JE. Beta-chemokine receptor CCR5 signals via the novel tyrosine kinase RAFTK. *Blood* 1998; 91:791-797.
47. Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Ownbey RT, Celestin J, Leder P, Luster AD. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat Med* 1996; 2:449-256.
48. Geminder H, Sagi-Assif O, Goldberg L, Meshel T, Rechavi G, Witz IP, Ben-Baruch A. A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. *J Immunol* 2001; 167:4747-4757.
49. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001; 2:108-115.
50. Gillen CD, Andrews HA, Prior P, Allan RN. Crohn's disease and colorectal cancer. *Gut* 1994; 35:651-655.
51. Goldberg RM, Fleming TR, Tangen CM, Moertel CG, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA. Surgery for recurrent colon cancer: strategies for identifying resectable recurrence and success rates after resection. Eastern Cooperative Oncology Group, the North Central Cancer Treatment Group, and the Southwest Oncology Group. *Ann Intern Med* 1998; 129:27-35.
52. Graness A, Chwieralski CE, Reinhold D, Thim L, Hoffmann W. Protein kinase C and ERK activation are required for TFF-peptide-stimulated bronchial epithelial cell migration and tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secretion. *J Biol Chem* 2002; 277:18440-18446.
53. Grimm MC, Doe W. Chemokines in inflammatory bowel disease: expression of RANTES, macrophage inflammatory protein (MIP)-1, MIP-1b, and interferon-inducible protein 10 by macrophages, lymphocytes, endothelial cells and granulomas. *Inflamm Bow Dis* 1996; 30:234-246
54. Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P, Doe WF. Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa. *J Leukoc Biol* 1996; 59:804-812.

55. 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; 39:207-211.
56. Herold G. Innere Medizin, 6. ergänzte Auflage. Verlag Arzt+Information 2006; ISBN:3-9807384-3-4.
57. Hieshima K, Imai T, Opdenakker G, Van Damme J, Kusuda J, Tei H, Sakaki Y, Takatsuki K, Miura R, Yoshie O, Nomiya H. Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem* 1997; 272:5846-5853.
58. Homey B, Muller A, Zlotnik A. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nat Rev Immunol* 2002; 2:175-184.
59. Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, Catron D, Buchanan ME, Müller A, deWaal Malefyt R, Deng G, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Lebecque S, Caux C, Zlotnik A. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol* 2000; 164:6621-6632.
60. Hommes D, van den Blink B, Plasse T, Bartelsman J, Xu C, Macpherson B, Tytgat G, Peppelenbosch M, Van Deventer S. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122:7-14.
61. Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* 2003; 52:144-151.
62. Hoover DM, Boulegue C, Yang D, Oppenheim JJ, Tucker K, Lu W, Lubkowski J. The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins. *J Biol Chem* 2002; 277:37647-37654.
63. Howard OM, Oppenheim JJ, Wang JM. Chemokines as molecular targets for therapeutic intervention. *J Clin Immunol* 1999; 19:280-292.
64. Hromas R, Gray PW, Chantry D, Godiska R, Krathwohl M, Fife K, Bell GI, Takeda J, Aronica S, Gordon M, Cooper S, Broxmeyer HE, Klemsz MJ. Cloning and characterization of exodus, a novel beta-chemokine. *Blood* 1997; 89:3315-3322.
65. Huber AR, Kunkel SL, Todd RF 3rd, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 1991; 254:99-102.

66. Iwasaki A, Kelsall BL. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 2000; 191:1381-1394.
67. Izadpanah A, Dwinell MB, Eckmann L, Varki NM, Kagnoff MF. Regulated MIP-3alpha/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280:G710-G719.
68. Jijon HB, Panenka WJ, Madsen KL, Parsons HG. MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283:C31-C41.
69. Johnatty RN, Taub DD, Reeder SP, Turcovski-Corrales SM, Cottam DW, Stephenson TJ, Rees RC. Cytokine and chemokine regulation of proMMP-9 and TIMP-1 production by human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 1997; 158:2327-2333.
70. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298:1911-1912.
71. Jordan NJ, Kolios G, Abbot SE, Sinai MA, Thompson DA, Petraki K, Westwick J. Expression of functional CCR6 chemokine receptors on human colonic epithelial cells. *J Clin Invest* 1999; 104:1061-1069.
72. Kao CY, Huang F, Chen Y, Thai P, Wachi S, Kim C, Tam L, Wu R. Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF-kappaB-dependent signaling pathway. *J Immunol* 2005; 175:6676-6685.
73. Kaser A, Ludwiczek O, Holzmann S, Moschen AR, Weiss G, Enrich B, Graziadei I, Dunzendorfer S, Wiedermann CJ, Murzl E, Grasl E, Jasarevic Z, Roni N, Offner FA, Tilg H. Increased Expression of CCL20 in Human Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Immunol* 2004; 24:74-85.
74. Katchar K, Kelly CP, Keates S, O'brien MJ, Keates AC. MIP-3alpha neutralizing monoclonal antibody protects against TNBS-induced colonic injury and inflammation in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292:1263-1271.
75. Katzka I, Brody RS, Morris E, Katz S. Assessment of colorectal cancer risk in patients with ulcerative colitis: Experience from a private practice. *Gastroenterology* 1983; 85:22-29.
76. Keates S, Keates AC, Mizoguchi E, Bhan A, Kelly CP. Enterocytes are the primary source of the chemokine ENA-78 in normal colon and ulcerative colitis. *Am J Physiol* 1997; 273:G75-G82.

77. Keshavarzian A, Fusunyan RD, Jacyno M, Winship D, MacDermott RP, Sanderson IR. Increased interleukin-8 (IL-8) in rectal dialysate from patients with ulcerative colitis: evidence for a biological role for IL-8 in inflammation of the colon. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:704-712.
78. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL, Locksley RM, Haynes L, Randall TD, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol* 2007; 8:369-377.
79. Kimsey TF, Campbell AS, Albo D, Wang TN. Colocalization of macrophage inflammatory protein-3alpha (Mip-3alpha) and its receptor, CCR6, promotes pancreatic cancer cell invasion. *Cancer J* 2004; 10:374-380.
80. Kleeff J, Kusama T, Rossi DL, Ishiwata T, Maruyama H, Friess H, Buchler MW, Zlotnik A, Korc M. Detection and localization of Mip-3alpha/LARC/Exodus, a macrophage proinflammatory chemokine, and its CCR6 receptor in human pancreatic cancer. *Int J Cancer* 1999; 81:650-657.
81. Klier CM, Nelson PJ. Chemokine-induced extravasation of MonoMac 6 cells: chemotaxis and MMP activity. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878:575-577.
82. Kohler RE, Caon AC, Willwnborg DO, Clark-Lewis I. A role for macrophage inflammatory protein-3alpha/CC chemokine ligand 20 in immune priming during T cell-mediated inflammation of the central nervous system. *J Immunol* 2003; 170:6298-6306.
83. Kreisel W. Pathogenesis of chronic inflammatory bowel diseases. *Schweiz Rundsch Med Prax* 2006; 95:1965-1973.
84. Kusunoki A, Saitou T, Miyano-Kurosaki N, Takaku H. Inhibition of the human chemokine receptor CXCR4 by antisense phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides. *FEBS Lett* 2001; 488:64-68.
85. Kwon JH, Keates S, Bassani L, Mayer LF, Keates AC. Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3alpha (MIP-3alpha) production in normal colon and inflammatory bowel disease. *Gut* 2002; 51:818-826.
86. Lichtenstein GR. Treatment of fistulizing Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000; 119:1132-1147.
87. Loetscher P, Gong JH, Dewald B, Baggiolini M, Clark-Lewis I. N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1 with CXC chemokine receptor 4 agonist and antagonist activities. *J Biol Chem* 1998; 273:22279-22283.
88. Lugerling A, Kucharzik T, Soler D, Picarella D, Hudson JT 3rd, Williams IR. Lymphoid precursors in intestinal cryptopatches express CCR6 and undergo dysregulated development in the absence of CCR6. *J Immunol* 2003; 171:2208-2215.

89. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338:436-445.
90. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998; 153:865-873.
91. Mahida YR, Ceska M, Effenberger F, Kurlak L, Lindley I, Hawkey CJ. Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in active ulcerative colitis. *Clin Sci (Colch)* 1992; 82:273-275.
92. Mazzucchelli L, Hauser C, Zraggen K, Wagner H, Hess M, Laissue JA, Mueller C. Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. *Am J Pathol* 1994; 144:997-1007.
93. Mazzucchelli L, Hauser C, Zraggen K, Wagner HE, Hess MW, Laissue JA, Mueller C. Differential in situ expression of the genes encoding the chemokines MCP-1 and RANTES in human inflammatory bowel disease. *J Pathol* 1996; 178:201-206.
94. Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Watanabe K, Tateishi H, Nishiyama T, Saiki T, Ikeda H, Tsuruta O, Tanikawa K. IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1994; 96:432-436.
95. Moller C, Stromberg T, Juremalm M, Nilsson K, Nilsson G. Expression and function of chemokine receptors in human multiple myeloma. *Leukemia* 2003; 17:203-210.
96. Muehlhoefer A, Saubermann LJ, Gu X, Luedtke-Heckenkamp K, Xavier R, Blumberg RS, Podolsky DK, MacDermott RP, Reinecker HC. Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J Immunol* 2000; 164:3368-3376.
97. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410:50-56.
98. Murakami T, Nakajima T, Koyanagi Y, Tachibana K, Fujii N, Tamamura H, Yoshida N, Waki M, Matsumoto A, Yoshie O, Kishimoto T, Yamamoto N, Nagasawa T. A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *J Exp Med* 1997; 186:1389-1393.
99. 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;198:1951-1957.

100. Nelson PJ, Krensky AM. Chemokines, chemokine receptors and allograft rejection. *Immunity* 2001; 14:377-386.
101. Netter FH. Netters Innere Medizin. Thieme 2000; ISBN:3-13-123961-1.
102. Neurath MF. IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat Med* 2007; 13:26-28
103. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005; 307:254-258.
104. Niess JH, Reinecker HC. Lamina propria dendritic cells in the physiology and pathology of the gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21:687-691.
105. O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 1999; 163:6718-6724.
106. Pan J, Kunkel EJ, Gossler U, Lazarus N, Langdon P, Broadwell K, Vierra MA, Genovese MC, Butcher EC, Soler D. A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues. *J Immunol* 2000; 165:2943-2949.
107. Pan Y, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, Vath J, Gosselin M, Ma J, Dussault B, Woolf E, Alperin G, Culpepper J, Gutierrez-Ramos JC, Gearing D. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 1997; 387:611-617.
108. Papadakis KA, Prehn J, Nelson V, Cheng L, Binder SW, Ponath PD, Andrew DP, Targan SR. The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. *J Immunol* 2000; 165:5069-5076.
109. Papadakis KA, Targan SR. The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6:303-313.
110. 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; the 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; Jun 6; [Epub ahead of print]

111. Perez-Canadillas JM, Zaballos A, Gutierrez J, Varona R, Roncal F, Albar JP, Marquez G, Bruix M. NMR solution structure of murine CCL20/MIP-3alpha, a chemokine that specifically chemoattracts immature dendritic cells and lymphocytes through its highly specific interaction with the beta-chemokine receptor CCR6. *J Biol Chem* 2001; 276:28372-28379.
112. Post GR, Brown JH. G protein-coupled receptors and signaling pathways regulating growth responses. *FASEB* 1996; 10:741-749
113. Present DH. Crohn's fistula: current concepts in management. *Gastroenterology* 2003; 124:1629-1635.
114. Proudfoot AE. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:106-115
115. Puleston J, Cooper M, Murch S, Bid K, Makh S, Ashwood P, Bingham AH, Green H, Moss P, Dhillon A, Morris R, Strobel S, Gelinis R, Pounder RE, Platt A. A distinct subset of chemokines dominates the mucosal chemokine response in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21:109-120.
116. Quaglietta L, te Velde A, Staiano A, Troncone R, Hommes DW. Functional consequences of NOD2/CARD15 mutations in Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 44:529-539.
117. Reinecker HC, Loh EY, Ringler DJ, Mehta A, Rombeau JL, MacDermott RP. Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterology* 1995; 108:40-50.
118. Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. Basislehrbuch Innere Medizin, 3. Auflage. Urban & Fischer 2006; ISBN:3-437-41052-0.
119. Rhodes JM. The role of Escherichia coli in inflammatory bowel disease. *Gut* 2007; 56:610-612.
120. Robledo MM, Bartolome RA, Longo N, Rodriguez-Frade JM, Mellado M, Longo I, van Muijen GN, Sanchez-Mateos P, Teixido J. Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. *J Biol Chem* 2001; 276:45098-45105.
121. Rodig SJ, Jones D, Shahsafaei A, Dorfman DM. CCR6 is a functional chemokine receptor that serves to identify select B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol* 2002; 33:1227-1233.
122. Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nunez L, Rossman R, Reid K, Moelling K, Yancopoulos GD, Glass DJ. Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway. *Science* 1999; 286:1738-1741.

123. Rossi DL, Vicari AP, Franz-Bacon K, McClanahan TK, Zlotnik A. Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-3alpha and MIP-3beta. *J Immunol* 1997; 158:1033-1036.
124. Rot A. Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism. *Eur J Immunol* 1993; 23:303-306.
125. Ruth JH, Shahrara S, Park CC, Morel JC, Kumar P, Qin S, Koch AE. Role of macrophage inflammatory protein-3alpha and its ligand CCR6 in rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 2003; 83:579-88.
126. Salazar-Gonzalez RM, Niess JH, Zammit DJ, Ravindran R, Srinivasan A, Maxwell JR, Stoklasek T, Yadav R, Williams IR, Gu X, McCormick BA, Pazos MA, Vella AT, Lefrancois L, Reinecker HC, McSorley SJ. CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. *Immunity* 2006; 24:508-510.
127. Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol* 2007; 19:70-83.
128. Schäfer C, Ross SE; Bragado MJ; Groblewski GE; Ernst SA; Williams JA. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp 27 pathway in cholecystokinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini, *J Biol Chem* 1998; 273:173-180
129. Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hofmann A. Hepatic metastases from colorectal carcinoma: impact of surgical resection on the natural history. *Br J Surg* 1990; 77:12416-12417.
130. Scheerens H, Hessel E, de Waal-Malefyt R, Leach MW, Rennick D. Characterization of chemokines and chemokine receptors in two murine models of inflammatory bowel disease: IL-10^{-/-} mice and Rag-2^{-/-} mice reconstituted with CD4⁺CD45RB^{high} T cells. *Eur J Immunol* 2001; 31:1465-1474.
131. Schmid M, Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger K, Stange EF. The role of defensins in the pathogenesis of chronic-inflammatory bowel disease. *Z Gastroenterol* 2004; 42:333-338.
132. Schnyder-Candrian S, Walz A. Neutrophil-activating protein ENA-78 and IL-8 exhibit different patterns of expression in lipopolysaccharide- and cytokinestimulated human monocytes. *J Immunol* 1997; 158:3888-3894.
133. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14:409-426.
134. Schwarz MK, Wells TN. New therapeutics that modulate chemokine networks. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1:347-358.

135. Sehgal A, Keener C, Boynton AL, Warrick J, Murphy GP. CXCR-4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells. *J Surg Oncol* 1998; 69:99-104.
136. Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature* 1993 ;365:654-657.
137. Sotsios Y, Whittaker GC, Westwick J, Ward SG. The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. *J Immunol* 1999; 163:5954-5963.
138. Struyf S, De Meester I, Scharpe S, Lenaerts JP, Menten P, Wang JM, Proost P, Van Damme J. Natural truncation of RANTES abolishes signaling through the CC chemokine receptors CCR1 and CCR3, impairs its chemotactic potency and generates a CC chemokine inhibitor. *Eur J Immunol* 1998; 28:1262-1271.
139. Sun YX, Wang J, Shelburne CE, Lopatin DE, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Pienta KJ, Taichman RS. Expression of CCR6 and CCL20 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem* 2003; 89:462-473.
140. Suzuki T, Hashimoto S, Toyoda N, Nagai S, Yamazaki N, Dong HY, Sakai J, Yamashita T, Nukiwa T, Matsushima K. Comprehensive gene expression profile of LPS-stimulated human monocytes by SAGE. *Blood* 2000; 96:2584-2591.
141. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 2002; 62:1832-1837.
142. Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* 1993; 361:79-82.
143. Tanaka Y, Imai T, Baba M, Ishikawa I, Uehira M, Nomiyama H, Yoshie O. Selective expression of liver and activation-regulated chemokine (LARC) in intestinal epithelium in mice and humans. *Eur J Immunol* 1999; 29:633-642.
144. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2001; 2:129-134.
145. Tilton B, Ho L, Oberlin E, Loetscher P, Baleux F, Clark-Lewis I, Thelen M. Signal transduction by CXC chemokine receptor 4. Stromal cell-derived factor 1 stimulates prolonged protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase 2 activation in T lymphocytes. *J Exp Med* 2000; 192:313-324.
146. Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 1997; 387:673-676.

147. Tremelling M, Cummings F, Fisher SA, Mansfield J, Gwilliam R, Keniry A, Nimmo ER, Drummond H, Onnie CM, Prescott NJ, Sanderson J, Bredin F, Berzuini C, Forbes A, Lewis CM, Cardon L, Deloukas P, Jewell D, Mathew CG, Parkes M, Satsangi J. IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007; 132:1657-1664.
148. Uguccioni M, Gionchetti P, Robbiani DF, Rizzello F, Peruzzo S, Campieri M, Baggiolini M. Increased expression of IP-10, IL-8, MCP-1, and MCP-3 in ulcerative colitis. *Am J Pathol* 1999; 155:331-336.
149. Uhlig HH, McKenzie BS, Hue S, Thompson C, Joyce-Shaikh B, Stepankova R, Robinson N, Buonocore S, Tlaskalova-Hogenova H, Cua DJ, Powrie F. Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity* 2006; 25:309-318.
150. Vaddi K, Newton RC. Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. *J Immunol* 1994; 153:4721-4732.
151. Varona R, Cadenas V, Flores J, Martinez-A C, Marquez G. CCR6 has a non-redundant role in the development of inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol* 2003; 33:2937-2946.
152. Varona R, Zaballos A, Gutierrez J, Martin P, Roncal F, Albar JP, Ardavin C, Marquez G. Molecular cloning, functional characterization and mRNA expression analysis of the murine chemokine receptor CCR6 and its specific ligand MIP-3alpha. *FEBS Lett* 1998; 440:188-194.
153. Waetzig GH, Seegert D, Rosenstiel P, Nikolaus S, Schreiber S. p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2002; 168:5342-5351.
154. Waetzig GH, Schreiber S. Review article: mitogen-activated protein kinases in chronic intestinal inflammation - targeting ancient pathways to treat modern diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18:17-32.
155. Wang W, Soto H, Oldham ER, Buchanan ME, Homey B, Catron D, Jenkins N, Copeland NG, Gilbert DJ, Nguyen N, Abrams J, Kershenovich D, Smith K, McClanahan T, Vicari AP, Zlotnik A. Identification of a novel chemokine (CCL28), which binds CCR10 (GPR2). *J Biol Chem* 2000; 275:22313-22323.
156. Wedemeyer J, Lorentz A, Goke M, Meier PN, Flemming P, Dahinden CA, Manns MP, Bischoff SC. Enhanced production of monocyte chemotactic protein 3 in inflammatory bowel disease mucosa. *Gut* 1999; 44:629-635.
157. 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* 2005; 102:18129-18134.

158. Widmann Chr, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen activated protein kinase: Conservation of three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999; 79:143-180
159. Wu Z, Hoover DM, Yang D, Boulegue C, Santamaria F, Oppenheim JJ, Lubkowski J, Lu W. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:8880-8885.
160. Xia M, Leppert D, Hauser SL, Sreedharan SP, Nelson PJ, Krensky AM, Goetzi EJ. Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane. *J Immunol* 1996; 156:160-167.
161. Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol* 2003; 74:448-455.
162. Yang CC, Ogawa H, Dwinell MB, McCole DF, Eckmann L, Kagnoff MF. Chemokine receptor CCR6 transduces signals that activate p130Cas and alter cAMP-stimulated ion transport in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288:C321-C328.
163. Yap AS. Initiation of cell locomotility is a morphogenetic checkpoint in thyroid epithelial cells regulated by ERK and PI3-kinase signals. *Cell Motil Cytoskeleton* 2001; 49:93-103.
164. Yoshie O, Imai T, Nomiyama H. Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. *J Leukoc Biol* 1997; 62:634-644
165. Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in organ-specific metastasis. *Contrib Microbiol* 2006;13:191-199.
166. Zlotnik A, Morales J, Hedrick JA. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol* 1999; 19:1-47.
167. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12:121-127.

8. Anhang

Curriculum vitae:

Persönliche Daten:

Name: Torsten Olszak
Anschrift: Neuherbergstr. 36, 80937 München
Geboren: 26. Februar 1980 in Kaufbeuren
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1986 - 1990 Grundschule, München
1990/91 Bernaysschule, München
1991 - 1998 Gisela-Gymnasium, München
1998 - 2000 Theodolinden-Gymnasium, München
30.06.2000 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife (Note: 1,4)

Wehrdienst:

07/2000 - 04/2001 Wehrdienst (Sanitätsakademie München)

Hochschulausbildung:

04/2001 - 04/2007 Studium der Humanmedizin an der Ludwigs-Maximilians-Universität München
01.04.2003 Ärztliche Vorprüfung

Famulaturen:

09 - 10/2003 Medizinische Klinik II, Station F6A, Klinikum Großhadern
04/2004 Herzchirurgie, Klinikum Großhadern
09/2004 HNO, plastische Operationen, Allergologie, Gärtnerklinik / Praxis, München
02 - 03/2005 Traumatologie, Tongji Hospital, Wuhan/China

Praktisches Jahr:

02 - 06/2006 Medizinische Klinik I und II, Station 4B und 8A, Klinikum Großhadern
06 - 10/2006 Chirurgie, Krankenhaus München-Schwabing

10/2006 - 01/2007 Orthopädie, Clinico Universitario San Cecilio,
Granada/Spanien

Promotion:

2003 - 2006 Dissertation bei PD Dr. Brand in der Medizinischen Klinik II, Klinikum Großhadern. Thema: „Expression, Signaltransduktion und biologische Funktionen des CCL20/CCR6-Chemokin-Ligand-Rezeptoren-Systemes in intestinalen Epithelzellen“

Preise:

2005 Travel Grant United European Gastroenterology Week, Kopenhagen. Abstract: “CCR6 mediated signals regulate proliferation and migration of colorectal cancer cells. ” (Erstautor)

2005 Travel Grant United European Gastroenterology Week, Kopenhagen. Abstract: “The novel IL-10 related cytokine IL-22 is increased in active Crohn`s disease” (Co-Autor)

2005 Travel Grant United European Gastroenterology Week, Kopenhagen. Abstract: “The novel Lambda-interferons IL-28A and IL-29 have antiviral properties against human Cytomegaly Virus in intestinal epithelial cells” (Co-Autor)

2005 Selected Abstract for Oral Presentation at Late Breaking Abstract Session at the Digestive Disease Week, Chicago, May 14-19, 2005. Abstract: “The novel lambda-interferons IL-28A and IL-29 mediate proinflammatory, antiproliferative, and antiviral signals in intestinal epithelial cells.”

2005 Selected Abstract for Oral Presentation at Late Breaking Abstract Session at the Digestive Disease Week, Chicago, May 14-19, 2005. Abstract: “Intestinal epithelial cell expressed CCR6 mediates epithelial cell restitution and cell proliferation.”

Publikationen

1. Brand S*, **Olszak T***, Beigel F, Diebold J, Otte JM, Göke B, Eichhorst ST, Dambacher J. Cell differentiation dependent expressed CCR6 mediates ERK-1/2, SAPK/JNK and signaling resulting in proliferation and migration of colorectal cancer cells. *J Cell Biochem* 2006; 97:709-723.
*** geteilte Erstautorenschaft**
2. Brand S, Beigel F, **Olszak T**, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Diepolder H, Marquardt A, Jagla W, Popp A, Leclair S, Herrmann K, Seiderer J, Ochsenkühn T, Göke B, Auernhammer CJ, Dambacher J. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290:G827-G838
3. Brand S*, Dambacher J*, Beigel F, **Olszak T**, Diebold J, Otte JM, Göke B, Eichhorst ST. CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Exp Cell Res* 2005; 310:117-130.
4. Brand S, Beigel F, **Olszak T**, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Diebold J, Diepolder H, Adler B, Auernhammer CJ, Göke B, Dambacher J. IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289:G960-G968.
5. Brand S, Zitzmann K, Dambacher J, Beigel F, **Olszak T**, Vlotides G, Eichhorst ST, Göke B, Diepolder H, Auernhammer CJ. SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2',5'-OAS and MxA induced by the novel interferon-lambdas IL-28A and IL-29. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331:543-548.

6. Brand S, Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, **Olszak T**, Steib C, Storr M, Göke B, Diepolder H, Bilzer M, Auernhammer CJ. IL-22 mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, 292:1019-1028.

Abstracts

1. Brand S, Dambacher J, **Olszak T**, Beigel F, Sisic Z, Eichhorst S, Göke B. CXCR4 mediated signals stimulate intestinal epithelial cell migration and cell proliferation. 12th United European Gastroenterology Week, Prague, Czech Republic, September 25-29, 2004 *Gut* 2004; 53:A132.
2. Brand S, Dambacher J, **Olszak T**, Beigel F, Sisic Z, Eichhorst S, Göke B. CXCR4-induzierte Signaltransduktionswege beeinflussen Proliferation und Migration von intestinalen Epithelzellen. 59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, September 1-4, 2004, Leipzig, Germany. *Z Gastroenterol* 2004; 42:840.
3. Brand S, Beigel F, **Olszak T**, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Göke B, Diepolder H, Adler B, Auernhammer C, Dambacher J. The novel lambda-interferons IL-28A and IL-29 mediate proinflammatory, antiproliferative, and antiviral signals in intestinal epithelial cells.
Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 14-19, 2005, Chicago, USA. Oral Presentation at the Distinguished Late Breaking Abstract Session. *Gastroenterology* 2005; 129:371.
4. Brand S, Beigel F, Dambacher J, **Olszak T**, Eichhorst ST, Zitzmann K, Diepolder H, Auernhammer C. SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2,5-OAS and MxA induced by the novel interferon-lambda's IL-28A and IL-29.
Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 14-19, 2005, Chicago, USA. *Gastroenterology* 2005; 128:A751.

5. Brand S, Dambacher J, Beigel F, **Olszak T**, Diebold J, Otte JM, Göke B, Eichhorst ST. CXCR4 mediated signals regulate migration and invasion of colorectal cancer cells.
Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 14-19, 2005, Chicago, USA. *Gastroenterology* 2005; 128:A478.
6. Brand S, **Olszak T**, Dambacher J, Beigel F, Otte JM, Göke B, Eichhorst ST. Intestinal epithelial cell expressed CCR6 mediates epithelial cell restitution and cell proliferation.
Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 14-19, 2005, Chicago, USA. Oral Presentation. *Gastroenterology* 2005; 128:A142.
7. Brand S, Beigel F, Dambacher J, **Olszak T**, Eichhorst ST, Zitzmann K, Adler B, Göke B, and Auernhammer C. The novel IL-10 related cytokine IL-22 mediates proinflammatory, antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells.
Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 14-19, 2005, Chicago, USA. Oral Presentation. *Gastroenterology* 2005; 128:A18.
8. Brand S, Beigel F, Dambacher J, **Olszak T**, Eichhorst ST, Zitzmann K, Auernhammer C, and Diepolder H. The novel cytokines IL-28A and IL-29 exhibit antiproliferative and antiviral properties in liver cells.
Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 14-19, 2005, Chicago, USA. *Gastroenterology* 2005; 128:A751.
9. Dambacher J, Beigel F, **Olszak T**, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Diepolder H, Auernhammer CJ, Göke B, Brand S. The novel IL-10 related cytokine IL-22 is increased in active Crohn's disease and induces proinflammatory gene expression and migration of intestinal epithelial cells. Abstract CD of the World Congress of Gastroenterology: Global Goals in

- Gastroenterology – Expanding Horizons in the 21st Century. Montreal, Canada, September 12-14, 2005.
10. Zitzmann K, Dambacher J, Beigel F, **Olszak T**, Diepolder H, Göke B, Auernhammer CJ, Brand S. IL-22 induced signaling mediates liver cell regeneration and is abrogated by SOCS-1 overexpression. Abstract CD of the World Congress of Gastroenterology: Global Goals in Gastroenterology – Expanding Horizons in the 21st Century. Montreal, Canada, September 12-14, 2005.
 11. Dambacher J, **Olszak T**, Beigel F, Diebold J, Otte JM, Eichhorst ST, Göke B, Brand S. Intestinal epithelial cell expressed CCR6 mediates epithelial cell restitution and cell proliferation. Abstract CD of the World Congress of Gastroenterology: Global Goals in Gastroenterology – Expanding Horizons in the 21st Century. Montreal, Canada, September 12-14, 2005.
 12. Dambacher J, Beigel F, **Olszak T**, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Adler B, Diepolder H, Göke B, Auernhammer CJ, Brand S. The novel lambda-interferons IL-28A and IL-29 mediate proinflammatory, antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells. Abstract CD of the World Congress of Gastroenterology: Global Goals in Gastroenterology – Expanding Horizons in the 21st Century. Montreal, Canada, September 12-14, 2005.
 13. **Olszak T**, Dambacher J, Beigel F, Diebold J, Otte JM, Eichhorst ST, Göke B, Brand S. CCR6 mediated signals regulate proliferation and migration of colorectal cancer cells. 13th United European Gastroenterology Week, Copenhagen, Denmark, October 15-19, 2005. *Gut* 2005; 54:A161
 14. Beigel F, Dambacher J, **Olszak T**, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Diepolder H, Auernhammer C, Göke B, Brand S. The novel IL-10 related cytokine IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes the intestinal barrier integrity. 13th United European Gastroenterology Week, Copenhagen, Denmark, October 15-19, 2005. Oral Presentation. *Gut* 2005; 54:A61

15. Zitzmann K, Dambacher J, Beigel F, **Olszak T**, Diepolder H, Göke B, Auernhammer CJ, Brand S. IL-22 induced signaling mediates liver cell regeneration and is abrogated by SOCS-1 overexpression. 13th United European Gastroenterology Week, Copenhagen, Denmark, October 15-19, 2005. *Gut* 2005; 54:A211
16. Dambacher J, Beigel F, **Olszak T**, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Adler B, Diepolder H, Göke B, Auernhammer C, Brand S. The novel lambda-interferons IL-28A and IL-29 have antiviral properties against human Cytomegaly Virus (CMV) in intestinal epithelial cells. 13th United European Gastroenterology Week, Copenhagen, Denmark, October 15-19, 2005. *Gut* 2005; 54:A142
17. Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, **Olszak T**, Diepolder H, Göke B, Auernhammer CJ, Brand S. IL-22 induced signaling mediates liver cell regeneration and is abrogated by SOCS-1 overexpression. Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 20-25, 2006, Los Angeles, USA. Oral Presentation. *Gastroenterology* 2006; 130:A752
18. Brand S, Dambacher J, Beigel F, Storr M, **Olszak T**, Zitzmann K, Göke B, Auernhammer CJ, Kaul A, Bartenschlager R, Diepolder H. The novel lambda-interferons IL-28A and IL-29 inhibit HCV replication in vitro and hepatic IL-28 mRNA expression is increased in HCV and CMV infection in vivo. Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 20-25, 2006, Los Angeles, USA. *Gastroenterology* 2006; 130:A835

19. Dambacher J, Beigel F, Golluscio R, **Olszak T**, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Seiderer J, Diepolder H, Auernhammer CJ, Ochsenkühn T, Göke B, Brand S. The novel IL-10 related cytokine IL-26 is increased in active inflammatory bowel disease and intestinal epithelial cells express the functional IL-26 receptor complex.
Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 20-25, 2006, Los Angeles, USA.
Gastroenterology 2006; 130:A696
20. Dambacher J, Beigel F, **Olszak T**, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Seiderer J, Diepolder H, Auernhammer CJ, Ochsenkühn T, Göke B, Brand S. The novel IL-10 related cytokine IL-26 is increased in active inflammatory bowel disease and intestinal epithelial cells express the functional IL-26 receptor complex. 14th United European Gastroenterology Week, Berlin, October 21-25, 2006.
21. Beigel F, Dambacher J, Storr M, **Olszak T**, Zitzmann K, Göke B, Auernhammer C, Kaul A, Bartenschlager R, Diepolder H, Brand S. The novel lambda-interferons IL-28A and IL-29 inhibit HCV replication in vitro and hepatic IL-28 mRNA expression is increased in HCV and CMV in vivo. 14th United European Gastroenterology Week, Berlin, October 21-25, 2006.
22. Brand S, Dambacher J; Beigel F, Zitzmann K, **Olszak T**, Prüfer T, Steib C, Storr M, Göke B, Diepolder H, Bilzer M, Auernhammer CJ. IL-22 mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression. 14th United European Gastroenterology Week, Berlin, October 21-25, 2006.

Danksagung

Herrn PD Dr. S. Brand danke ich für die Übernahme der Dissertation, die Betreuung, konstruktive Kritik und Führung der Arbeit in praktischen und theoretischen Fragen sowie für wichtige Anregungen bei der Erstellung der vorliegenden Dissertation.

Frau Julia Dambacher danke ich für ihre fachliche Kompetenz, ihre Hilfe und ihre Freundschaft.

Frau Zeljka Sisic danke ich für die Unterstützung auf fachlichen Wege und die offene Bereitschaft, bei vielen Problemen mit Rat zu Seite zu stehen.

Herrn F. Beigel danke ich für die konstruktiven Diskussionen bei der Durchführung der einzelnen Methoden.

Herrn Prof. Dr. J. Diebold danke ich für die rasche und unkomplizierte Kooperation bei der Anfertigung der Immunhistochemie.

Frau Dr. J. Seiderer danke ich herzlich für die gute kooperative Zusammenarbeit.