Charakterisierung eines neuen Colitis ulcerosa Modells in NOD Scid IL2Rγ Chain^{null} Mäusen mit humanisiertem Immunsystem

von Pia Fiona Palamides

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Charakterisierung eines neuen Colitis ulcerosa Modells in NOD Scid IL2Rγ Chain^{null} Mäusen mit humanisiertem Immunsystem

von Pia Fiona Palamides aus Sindelfingen

München, 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt am Klinikum der Universität München:
Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß-, und Transplantationschirurgie
Mentor: Prof. Dr. Matthias Siebeck

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf
Korreferent/en:	Priv.-Doz. Dr. Bianka Schulz

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

Meinen Eltern und Großeltern

INHALTSVERZEICHNIS

1 Abkürzungsverzeichnis .....

2 Publikationen .....

3 Einleitung 1

4 Literaturübersicht 1

4.1 Colitis ulcerosa 1

4.1.1 Definition 1

4.1.2 Vorkommen 1

4.1.3 Ätiologie 1

4.1.4 Pathogenese 3

4.2 Klinische Symptome 4

4.2.1 Verlauf 4

4.2.2 Diagnose 5

4.2.3 Therapie 7

4.2.4 Spätfolgen 8

4.3 Immunologie 9

4.3.1 Die Rolle der angeborenen Immunantwort 9

4.3.2 Die Rolle der adaptiven Immunantwort 13

4.3.3 Zytokine und Chemokine 16

4.3.4 Inflammatorische Stadien 17

4.3.5 Übersicht über die immunologischen Vorgänge 18

4.4 Tiermodelle in der Erforschung von Colitis ulcerosa 19

4.4.1 DSS – Kolitis 19

4.4.2 TNBS – Kolitis 20

4.4.3 Oxazalon – Kolitis 20

4.5 NOD-scid IL2Rγ^{null} Mäuse 21

5 Fragestellung und Ziele 22

5.1 Fragestellung 22

5.2 Ziele 23

6 Material und Methoden 26

6.1 Rekrutierung und Auswahl der Spender 26

6.2 Tierhaltung 26

6.3 Isolierung der PBMC für die Rekonstitution der Mäuse ... 26
6.4 Rekonstitution ... 27
6.5 Versuchsgruppen ... 27
6.6 Behandlungsprotokoll ... 29
6.7 Medikamenten- und Ethanolapplikation ... 29
6.8 Tierzahl ... 30
6.9 Klinischer Aktivitätsscore ... 30
6.10 Makroskopische Bewertung des Kolons ... 32
6.11 Analysen nach Versuchsende ... 32
6.12 FACS-Färbung ... 34
6.13 FACS-Gatingstrategie ... 34
6.14 Histologie ... 36
6.15 Hämatoxylin-Eosin-Färbung ... 36
6.16 Histologischer Score ... 37
6.17 Isolierung von humanen Lamina propria Zellen ... 38
6.18 Isolierung PBMC zur FACS-Analyse ... 40
6.19 Statistische Auswertung ... 40
6.20 Herstellerangaben ... 40
7 Ergebnisse ... 42
7.1 Auswertung der Spender ... 42
7.2 Etablierung einer Modell-Kolitis durch rektales Ethanol ... 43
7.2.1 Die Wirkung von Ethanol auf die klinische Aktivität ... 43
7.2.2 Die Wirkung von Ethanol auf das histologische Bild des Kolons ... 45
7.2.3 Unterscheidung zwischen gesund und krank im Tiermodell ... 47
7.3 Charakterisierung der immunologischen Vorgänge in der Maus und im Patienten ... 48
7.3.1 Die Wirkung von Ethanol auf die immunologischen Vorgänge ... 48
7.3.2 Charakterisierung der immunologischen Vorgänge im Kolon der Maus ... 54
7.4 Effekte durch einen TNFα Inhibitor ... 55
7.4.1 Die Wirkung von Infliximab auf die klinische Aktivität ... 55
7.4.2 Die Wirkung von Infliximab auf das histologische Bild des Kolons ... 56
7.4.3 Die Wirkung von Infliximab auf das immunologische Profil ... 57
7.5 Effekte durch einen IL-4/13 Inhibitor ... 59

7.5.1 Die Wirkung von Pitrakinra auf die klinische Aktivität 59
7.5.2 Die Wirkung von Pitrakinra auf das histologische Bild des Kolons 59
7.5.3 Die Wirkung von Pitrakinra auf das immunologische Profil 61
7.6 Herstellung eines Zusammenhangs zwischen den beteiligten Zellen und der klinischer Aktivität der Kolitis 62
8 Diskussion 63
8.1 Profil der Spender 63
8.2 Ziel I Etablierung einer Modell-Kolitis durch rektales Ethanol 63
8.2.1 Hypothesen 1.1 und 1.2: Klinischer Aktivitätsscore 63
8.2.2 Hypothese 1.3: Histologische Veränderungen 63
8.2.3 Hypothese 1.4 Unterscheidung zwischen gesund und krank im Tiermodell 64
8.3 Ziel II.: Charakterisierung der immunologischen Vorgänge in der Maus 65
8.3.1 Hypothese 2.1: $CD45^+$ 65
8.3.2 Hypothesen 2.1 - 2.3: $CD4^+$ 65
8.3.3 Hypothesen 2.1 - 2.4: $CD8^+$ 65
8.3.4 Hypothesen 2.1 - 2.3: $CD64^+CD14^+$ 66
8.3.5 Hypothesen 2.1 - 2.3: CD163+CD14+ 66
8.3.6 Hypothese 2.1 - 2.3: $CD14^+CD1a^+$ und $CD11b^+CD1a^+$ 67
8.3.7 Charakterisierung der immunologischen Vorgänge im Kolon der Maus 67
8.4 Ziel III.: Effekte durch Infliximab 69
8.4.1 Hypothesen 3.1 -3.3: Die Wirkung von Infliximab auf die klinische Aktivität 69
8.4.2 Hypothesen 3.4 - 3.5: Die Wirkung von Infliximab auf das immunologische Profil 70
8.5 Ziel IV.: Effekte durch Pitrakinra 72
8.5.1 Hypothesen 4.1 – 4.3: Die Wirkung von Pitrakinra auf die klinische Aktivität 72
8.5.2 Hypothese 4.4: Die Wirkung von Pitrakinra auf das immunologische Profil 73
8.6 Evaluierung der Übertragbarkeit auf den Menschen 74
8.7 Ausblick 75
8.8 Stärken und Schwächen des Modells 75
8.9 Limitationen dieser Arbeit 76
9 Zusammenfassung 77
10 Summary 79
11 Literaturverzeichnis 81

12 Anhang 92
12.1 Abbildungen zur Gatingstrategie 92
12.2 Tabellen zur statistischen Auswertung 95
12.3 Antikörper zur FACS-Analyse im Detail 99
12.4 Abbildungsverzeichnis 100
12.5 Tabellenverzeichnis 102
13 Eidestattliche Erklärung 103
15 Danksagung 104

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
APC	Allophycocyanin Farbstoff für die FACS-Analyse
B-Zelle	Aus dem Knochenmark stammender B-Lymphozyt
CD	*Cluster of differentiation*, Oberflächenmerkmal der Zellen
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CRP	C-reaktives Protein
DC	Dendritische Zelle
DSS	Dextransulfat
FACS	*Fluorescence associated cell sorting*, Durchflusszytometrie
FITC	Fluorescein Isothiocyanate Farbstoff zur FACS-Analyse
Foxp3	*Forkhead-Box-Protein P*, Transkriptionsfaktor
GATA3	Transkriptionsfaktor
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
Gr	Granulozyt
HGF	*Hepatocyte growth factor*, Wachstumsfaktor
IFNγ	Interferon γ
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-4R	Interleukin 4 Rezeptor
ILC	*Innate lymphoid cell*, angeborene; lymphoide Zelle
JAK	Januskinase, Transkriptionsfaktor
LPMC	Mononukleäre Zellen aus der Lamina propria des Kolons
Ma	Makrophage
MHC I	Haupthistokompatibilitätskomplex Typ I
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex Typ II
Mo	Monozyt
NaCl	Physiologische Kochsalzlösung

NF-κB	*Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer,* Transkriptionsfaktor
NOD-like Rezeptor	*Nucleotide-binding oligomerization domain receptor*
NOS	*Nitric oxygen species,* Reaktive Stickstoffverbindung
PBMC	Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut
PE	Phycoerythrin Farbstoff für die FACS-Analyse
PECy7	Phycoerythrin Cyanin 7 Farbstoff für die FACS-Analyse
PerCP Cy 5.5	Peridinin chlorophyll protein – Cyanin, Farbstoff für die FACS-Analyse
PRR	*Pathogen recognition receptor,* Mustererkennungsrezeptor
RORγt	*RAR-related orphan receptor γ,* Transkriptionsfaktor
ROS	*Reactive oxygen species,* Reaktive Sauerstoffmoleküle
STAT	*Signal transducer and activator of transcription,* Transkriptionsfaktor
TARC	*Thymus and activation - regulated chemokine,* Chemokin
T-bet	Transkriptionsfaktor
TCR	T-Zellrezeptor
TGFβ	*Transforming growth factor,* Wachstumsfaktor
Th0	Undifferenzierte T-Helferzelle
Th1 / 2 / 17	T-Helferzelle Typ 1 / 2 / 17
TLR	*Toll like receptor,* Mustererkennungsrezeptor
TNBS	2, 4, 6 Trinitrobenzensulfon Säure
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TYK	Tyrosinkinase, Transkriptionsfaktor
T-Zelle	Aus dem Thymus stammender T- Lymphozyt
UC	*Ulcerative colitis,* Colitis ulcerosa

2 PUBLIKATIONEN

Publikationen, in denen Teile dieser Arbeit bereits veröffentlicht sind:

"Characterization and validation of a mouse model for colitis ulcerosa based on NOD-scid IL2Rγ ^{null} mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells from patients"

P. Palamides[2] , M. Föhlinger[1], H. Jodeleit[2], F. Beigel[3], N. Herbach[4], T. Mueller[5], E. Wolf[2], M. Siebeck[1], R. Gropp[1]

Eingereicht im März 2016 in Disease, Models & Mechanisms.

„Immunological profiling of UC patients leads to identification of two inflammatory conditions and CD1a as a marker for UC"

M. Föhlinger[1]†, **P. Palamides[2]**†, U. Mansmann[3], F. Beigel[4], M. Siebeck[1], R. Gropp[1]

Eingereicht im Juni 2016 in Journal of Translational Medicine

3 EINLEITUNG

UC (Colitis ulcerosa) gehört zusammen mit Morbus Crohn zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Während Morbus Crohn alle Abschnitte des Gastrointestinaltrakts betreffen kann, finden sich die Läsionen durch UC nur im Dickdarm. Bei Diagnosestellung sind die Betroffenen im Durchschnitt zwischen 16 und 25 Jahre alt, [1] und auf Grund der Chronizität der Erkrankung benötigen die Patienten häufig eine dauerhafte Medikation. Die unvorhersehbaren Krankheitsschübe, die mit flüssig-blutigem Durchfall, Abdominalschmerzen und Tenesmen einhergehen, sind für die junge, berufstätige Patientengruppe eine große Belastung. Der immense Leidensdruck der Patienten und die enorme Belastung des staatlichen Gesundheitssystems [2] durch eine lebenslange Therapie verlangen nach einem besseren Verständnis der zugrundeliegenden pathologischen Mechanismen und der Entwicklung zuverlässigerer Tiermodelle, welche das Testen neuer Wirkstoffe in einer klinischen Phase II Studie sicherer und effektiver machen.

4 LITERATURÜBERSICHT

4.1 Colitis ulcerosa

4.1.1 Definition

Bei UC handelt es sich um eine chronische Entzündung des Dickdarms, die typischerweise in Schüben verläuft und durch multiple Schleimhautulzera gekennzeichnet ist.

4.1.2 Vorkommen

Die Angaben zur Epidemiologie von UC sind in der Literatur insgesamt uneinheitlich. Die Inzidenz von UC ist weltweit steigend [3], wobei die Industrienationen wesentlich stärker betroffen sind als die Entwicklungsländer. In Deutschland beträgt die Inzidenz 3 – 3,9 pro 100 000/ Jahr [4]. Die Prävalenz in Europa schwankt zwischen 2,4 und 294 Erkrankungen pro 100 000 Personen [5]. In Deutschland wird das Alter der Erstdiagnose mit 16-25 Jahren angegeben [4].

4.1.3 Ätiologie

Nach jetzigem Erkenntnisstand ist kein alleinstehender Auslöser für UC bekannt. In der Literatur werden diverse Ursachen diskutiert, wobei davon auszugehen ist, dass es sich um eine multifaktorielle Erkrankung handelt.

Genetik

In einer großangelegten Studie mit über 75 000 Proben konnten 163 unabhängige Genloci identifiziert werden, die eindeutig mit UC oder Morbus Crohn assoziiert sind [6]. Circa 12 % der UC Erkrankten haben Familienangehörige, die ebenfalls erkrankt sind, wobei der Grad der Verwandtschaft keinen signifikanten Einfluss hat [7]. Dennoch zeigten zwei Langzeitstudien, dass die genetische Prädisposition allein nicht die Ursache für UC sein kann, sondern auch bedacht werden sollte, dass enge Verwandte unter sehr ähnlichen Umweltbedingungen aufwachsen. In diesen Studien wurden retrospektiv eineiige Zwillinge im Alter von mindestens 45 Jahren zu ihrer Krankengeschichte befragt. Im Falle einer Diagnose von UC waren nur bei 18 % der Erkrankungsfälle beide Zwillinge betroffen [8]. In der zweiten Studie betrug die Übereinstimmung nur 15 % [9]. Andere immunmediierte Erkrankungen, die durch Epitheldestruktion und chronische Entzündung gekennzeichnet sind, wie zum Beispiel atopische Dermatitis, stellen ebenfalls ein erhöhtes Risiko dafür dar an CED zu erkranken [10].

Umweltfaktoren

Autoimmunerkrankungen werden sehr viel häufiger in den Industrienationen als in weniger entwickelten Ländern diagnostiziert. Auch innerhalb der Industrienationen zeigt sich eine Häufung von CED-Diagnosen in den urbanen Lebensräumen [11]. Der hohe hygienische Standard führt angeblich zu einem sehr geringen Kontakt mit pathogenen Keimen in der Kindheit. Im weiteren Verlauf des Lebens scheint deshalb das Risiko zu steigen, auf einen eigentlich harmlosen Reiz eine übersteigerte Immunantwort zu zeigen [12-15]. In einer kleineren Studie aus dem Jahr 2010 war das Risiko an UC zu erkranken nicht nur mit dem Leben in Ballungszentren positiv korreliert, sondern auch mit dem Bildungsstandard und dem sozialen Status [15]. Insgesamt wird die „Hygiene-Theorie“ in der Literatur kontrovers diskutiert und in einer prospektiven Studie von Castiglione *et al.* in Süditalien konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden [16]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass aktive Raucher seltener an UC erkranken, während das Risiko für ehemalige Raucher im Vergleich zur Nichtrauchenden Population deutlich erhöht ist [17-19].

Infektionen

In mehreren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen einer akuten gastrointestinalen Infektion mit Salmonella- oder Campylobacter Spezies und dem Risiko an UC zu erkranken nachgewiesen werden. Das Risiko ist im ersten Jahr nach der Infektion am höchsten, bleibt aber für die nächsten 15 Jahre erhöht [20-22].

4.1.4 Pathogenese

Die genaue Pathogenese von UC bleibt weiterhin unklar, obwohl generell Einigkeit darüber besteht, dass verschiedene Umweltfaktoren bei genetisch prädisponierten Personen eine dysregulierte Immunantwort verursachen, die dann wiederum zur typischen Symptomatik führt [23, 24]. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnte bewiesen werden, dass einer Störung in der Barriere des intestinalen Epithels eine Schlüsselrolle zukommt [25, 26]. Das intestinale Epithel hält durch seinen direkten Kontakt zur intestinalen Mikroflora und den absorbierten Nährstoffen ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Antigenabwehr und Antigentoleranz [27]. Dieser Gleichgewichtszustand wird im Folgenden als „*steady state*“ bezeichnet.

Die Barriere besteht dabei aus verschiedenen Teilen (siehe Abb.3). Zunächst liegt den Epithelzellen eine Mukusschicht auf, die von Becherzellen sezerniert und durch die Expression des Gens MUC2 vermittelt wird. Während sich in der äußeren Mukusschicht eine ganze Reihe an Bakterien aufhält ist die innere Mukusschicht, die direkten Kontakt zu den Epithelzellen hat, weitgehend steril. Bei Menschen mit CED konnten bisher keine Mutationen im MUC2-Gen nachgewiesen [28] werden. In einem Mausmodell zeigten MUC2-defiziente Mäuse aber eine signifikant schwerere und länger anhaltende Kolitis als Wildtypmäuse [29].

Zusätzlich zu den verschiedenen antibakteriellen Enzymen (Defensin, Kryptidin, Lysozym und Phospholipase aus Paneth-Zellen) befindet sich in der Mukusschicht auch eine große Menge an Immunglobulin A(IgA). IgA wird hier von B-Zellen produziert und dient der Opsonierung schädlicher Bakterien in der Mukusschicht [30]. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass es in IgA-defizienten Mäusen zu einem vermehrten Eindringen von pathogenen Keimen in die Epithelzellen kommt [31]. Zur Epithelzellschicht im Darm gehören neben den Enterozyten auch Becherzellen, endokrine Zellen, Paneth-Zellen, M-Zellen und Tuft-Zellen. Diese Zellen differenzieren sich alle aus den basal liegenden Stammzellen [32, 33].

Die Epithelzellen sind durch *tight junctions*, Desmosomen und *gap junctions* verbunden. Sie bilden nicht nur eine physikalische Barriere, sondern sie erkennen mittels *pattern recognition receptor* (PRR) auch schädliche Moleküle. Zu den PRR gehören neben dem *toll-like receptor* (TLR) auch der intrazellulär bindende Nukleotidrezeptor *NOD-like receptor* (NLR). Erkennen diese Rezeptoren passende Antigene erfolgt über den Transkriptionsfaktor *Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer* (NF-κB) die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine [34]. Tumornekrosefaktor (TNFα), Interferon γ (IFNγ) und Interleukin 13 (IL-13) induzieren dann einen weiteren Verlust der *tight junctions* und die Apoptose von intestinalen Epithelzellen [35-37].

Dieser Barriereverlust erhöht die trans- und parazelluläre Aufnahme von Antigen aus dem intestinalen Lumen und aktiviert vermehrt Immunzellen in der unterliegenden Lamina propria [38]. Es kommt zum Einstrom von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen. Der Einstrom von neutrophilen Granulozyten führt zur Kryptendestruktion und

zu Kryptenabszessen [39]. Außerdem produzieren neutrophile Granulozyten reaktive Sauerstoffmoleküle, welche die Zellen schädigen und zu den typischen Ulzerationen führen [40, 41]. Gleichzeitig kommt es durch Zellapoptose und Barriereverlust zu Ionenverlusten in das Lumen, die durch osmotisch folgendes Wasser den typischen Durchfall hervorrufen [42].

4.2 Klinische Symptome

Kennzeichnend für eine aktive UC sind blutige Durchfälle, Tenesmen und Abdominalschmerzen. Im Verlauf der Erkrankung kommt es häufig zu Fieber und Anämie. Bei lange anhaltenden Schüben kommen Gewichtsverlust und Zeichen von Mangelernährung hinzu. Ein validiertes System zur Einteilung der Krankheitsaktivität in drei Stufen ist der sogenannte „Mayo-Score“ [43]. Bewertet werden dabei die Stuhlfrequenz, Blutbeimengung, endoskopische Befunde und die allgemeine klinische Verfassung des Patienten. Bei der Bewertung ist eine Maximalsumme von 12 Punkten möglich.

- Remission (0-3 Punkte)
- Milde UC (4-6 Punkte)
- Moderate UC (7-9 Punkte)
- Schwere UC (10-12 Punkte)

Die Montreal-Klassifikation [44] teilt die Ausdehnung der Läsionen in folgende Krankheitsbilder ein, wobei eine anatomisch größere Ausbreitung auch eine schwerere Verlaufsform anzeigt:

- Ulzerative Proktitis (E1: Betroffen ist das Rektum bis maximal zum Rektumsigmoid)
- Linksseiten Kolitis (E2: Ausdehnung bis maximal zur Milzflexur)
- Pankolitis (E3: Ausdehnung bis proximal der Milzflexur)

4.2.1 Verlauf

Knapp 15 % aller Patienten erleiden im Laufe ihrer Erkrankung einen akut-fulminanten Schub [45]. Im Verlauf eines akut-fulminanten Schubes kommt es in ca. 5 % der stationär behandelten Patienten zur Entwicklung eines toxischen Megakolons, das eine sofortige chirurgische Intervention verlangt [46]. Auch ohne diese lebensbedrohliche Komplikation können 30 % der Patienten in einem akut-fulminanten Schub nur durch eine partielle Kolektomie in Remission gebracht werden [45].

Bei circa 85 % aller Diagnosen tritt UC in einer chronisch-rezidivierenden Form auf. Beschwerdefreie Phasen (komplette Remission) wechseln sich mit Phasen einer geringen

Krankheitsaktivität ab. Die Phasen der Remission sind unterschiedlich lang und in einer Studie der IBSEN Study Group waren 48% der Patienten mit diesem Krankheitsverlauf seit mehr als 5 Jahren beschwerdefrei [47].

Der chronisch-kontinuierliche Verlauf kennzeichnet sich durch eine stetige Krankheitsaktivität ohne Phasen der Remission. Die Tendenz ist progredient und bei ca. 20 %, der ursprünglich mit Proktitis oder Linksseitenkolitis vorgestellten Patienten, entwickelt sich im Laufe von 10 Jahren eine Pankolitis [47]. In Abbildung 1 sind die verschiedenen Verlaufsformen der Erkrankung grafisch dargestellt.

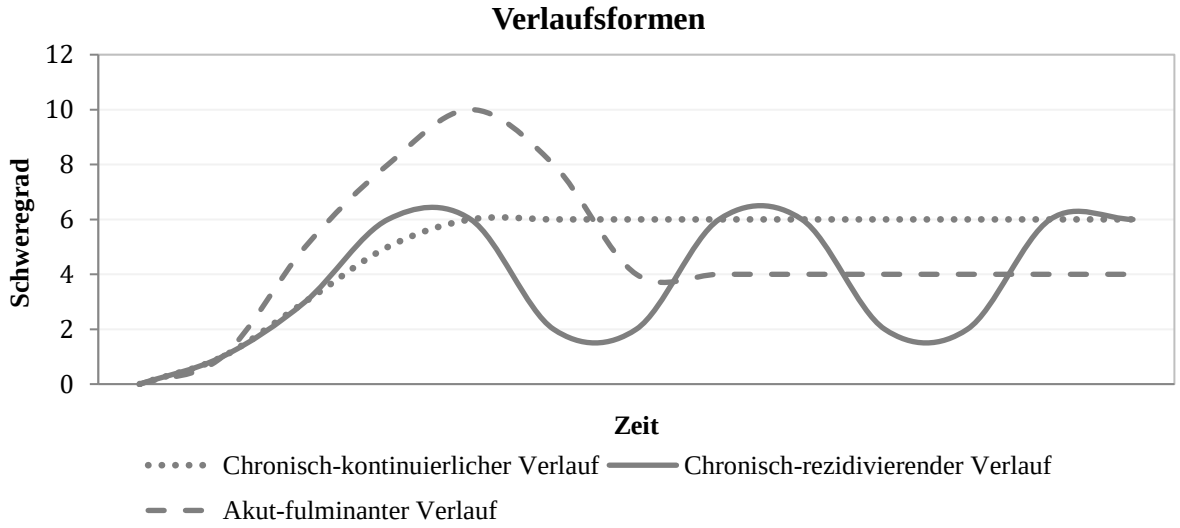


Abbildung 1: Verlaufsformen von UC

4.2.2 Diagnose

Die Diagnose UC sollte immer auf Grund einer Kombination von verschiedenen Untersuchungsmethoden gestellt werden, wobei die histologische Untersuchung von endoskopisch entnommenen Stufenbiopsien das sicherste Diagnostikum darstellt [4]. Dennoch ändert sich bei 10 % der Patienten die Diagnose noch einmal in den ersten fünf Jahren nach der Diagnosestellung [48], denn die Abgrenzung gegenüber Morbus Crohn ist nicht immer einfach.

Klinische Diagnose

Bei verdächtigen Beschwerden sollte nach einer gründlichen Anamnese eine klinische Untersuchung erfolgen. Zur speziellen Untersuchung gehören die Inspektion des Perianalbereichs, sowie eine rektale Untersuchung. Besondere Beachtung sollte auch den möglichen extraintestinalen Manifestationen (an Mund, Haut, Augen oder Gelenken) geschenkt werden [4]. Bei einer anschließenden Ileokoloskopie sollten aus allen

Darmsegmenten Proben entnommen werden, um neben der Diagnose auch Informationen über die Ausdehnung der Krankheit zu erhalten.

Labor

Bei jedem Patienten, der mit Verdacht auf UC vorgestellt wird, sollten mindestens ein Blutbild, der Eisenstatus und das C-reaktive Protein (CRP) bestimmt werden. CRP korreliert positiv mit der Ausdehnung der Erkrankung [49]. Im Stuhl können verschiedene neutrophile Entzündungsmarker bestimmt werden, wobei Calprotectin und Lactoferrin die einzigen Marker sind, die mit dem klinischen und endoskopischen Schweregrad eines Schubes korrelieren [50-53]. Calprotectin im Stuhl kann genutzt werden um UC diagnostisch vom Reizdarmsyndrom abzugrenzen [54].

Endoskopie

Endoskopisch zeigt sich das Gewebe brüchig, und die Gefäßzeichnung verschwindet zu Gunsten eines ausgeprägten Erythems. Zusätzlich zeigen sich Erosionen und/oder Ulzerationen. UC bildet häufig Pseudopolypen, aber keine Strikturen oder nur sehr selten Fisteln [55].

Histologie

Die erste Systematik zur histologischen Einstufung und Bewertung von UC wurde bereits 1956 von Truelove und Richards veröffentlicht. Seitdem wurden mehrere Systeme publiziert, die von einfachen 3-Stufen Einteilungen (geringgradig-mittelgradig-hochgradig) bis hin zur komplexen Beurteilung verschiedener Kriterien reichen [56]. Als validiert gelten der Harpaz-Index, 2003 [57] und der Geboes-Score, 2000 [58]. Histologisch werden folgende Veränderungen, in unterschiedlichen Ausprägungen, sichtbar:

- Kryptenarchitekturveränderungen / Kryptenatrophie
- Kryptendestruktion / Kryptenabszessen
- Chronische Entzündungszellinfiltrate / basale Plasmazytose
- Becherzellverlust
- eosinophile Granulozyten in der Lamina propria
- neutrophile Granulozyten in der Lamina propria
- neutrophile Granulozyten im Epithel
- Erosionen / Ulzerationen

4.2.3 Therapie

Medikation

Die Wahl der Medikation sollte auf Grund einer Einstufung der Krankheitsaktivität getroffen werden. Dafür eignet sich zum Beispiel der oben beschriebene Mayo-Score [59]. Die Krankheitsaktivität wird auf Basis verschiedener Parameter in die drei Schweregrade „mild“, „moderat“ und „schwer“ eingeteilt. Oberstes Ziel bei der konventionellen Therapie ist dabei eine steroidfreie-Remissionserhaltung. Eine Übersicht über die Therapiestufen ist in Abbildung 2 dargestellt. In allen Fällen von moderater Aktivität wird die Therapie mit der lokalen Applikation von 5-Aminosalicylaten begonnen [60]. 5-Aminosalicylate (Sulfasalazin, Mesalazin) sind Derivate der Salicylsäure und wirken antiinflammatorisch über die Blockade der Cyclooxygenase 1 und 2.

Hat die lokale Therapie keinen Erfolg sollten 5-Aminosalicylate oral verabreicht werden [61]. Bei Therapieversagen von 5-Aminosalicylaten oder moderat-schwerer Aktivität sollten Kortikosteroide zum Einsatz kommen, wobei die Applikation im Falle einer Proktitis (E1) lokal erfolgen kann. In allen anderen Fällen (Ausdehnung E2, E3) ist eine systemische Therapie indiziert [62]. Das Mittel der Wahl ist Budesonide [63].

Bei Therapieversagen oder zur Umstellung auf eine Kortikosteroid-freie Remissionserhaltung kann die Anwendung von Thiopurinen oder Methotrexat [64] indiziert sein. Methotrexat ist ein Folsäure-Antagonist, der die Zellteilung verhindert. In niedrigen Dosen wirkt Methotrexat immunsuppressiv. Thiopurin wirkt als Antimetabolit für die Purinbasen und verhindert ebenfalls die Zellteilung (Präparat: Azathioprin). Bei schwerer Krankheitsaktivität oder bei Therapieversagen erhalten Patienten TNFα Inhibitoren [65-67]. TNFα Inhibitoren sind monoklonale Antikörper und blockieren die Rezeptorbindung an der E-F Schleife von TNFα (Präparate: Infliximab, Adalimumab, Etanercept) [68].

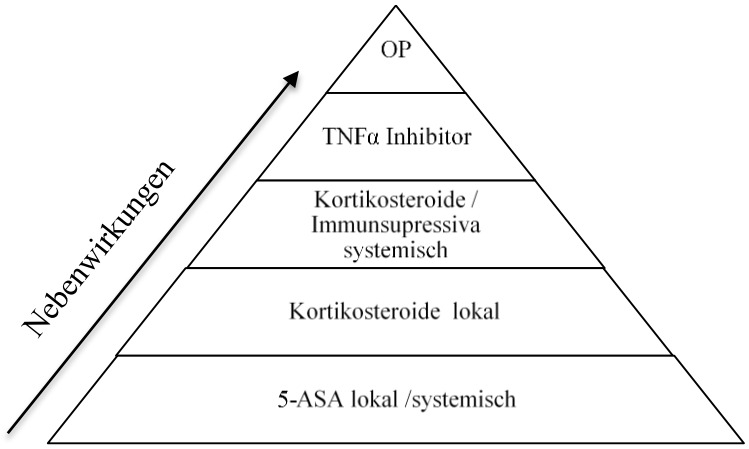


Abbildung 2: Übersicht über die medikamentöse Behandlung eines akuten Schubes UC.
Kann durch ein Medikament keine Remission erzeugt werden, ist jeweils die übergeordnete Stufe die Therapie der Wahl.

Chirurgie

Eine Indikation für eine chirurgische Intervention ist immer dann gegeben, wenn eine schwere Verlaufsform (nach Mayo) oder folgende Kriterien, nach Truelove & Witts [69] vorliegen:

- Blutige Diarrhoe > 6 mal / Tag
- Tachykardie > 90 Schläge/ Minute
- Fieber > 37, 8 °C
- Hb < 10,5 g/l

Je nach Schweregrad der systemischen Toxizität kann zunächst eine konservative Therapie versucht werden. Sollte nach sieben Tagen keine deutliche Besserung eintreten sind chirurgische Maßnahmen indiziert. Ein weiterer konservativer Therapieversuch sollte nicht durchgeführt werden, da dies retrospektiv eine höhere Mortalität und vermehrt postoperative Komplikationen nach sich zieht [70]. Die Operationsmethode der Wahl, falls eine tumoröse Entartung ausgeschlossen werden kann, ist die Proktokolektomie mit Ileumpouch. Zur Rekonstruktion werden ein Ileumpouch und eine Ileumpouch-anale Anastomose verwendet. Dabei wird ein temporäres Ileostoma angelegt, das nach gutem Heilungsverlauf aller Anastomosen zurück verlegt werden kann. Bei Patienten, in denen keine Kontinenz-erhaltende OP möglich ist, wird eine totale Proktokolektomie mit permanentem Ileostoma durchgeführt [71].

4.2.4 Spätfolgen

Innerhalb von 20 Jahren nach Diagnosestellung erkranken 5,3 % der Patienten an einem kolorektalen Karzinom. Das Risiko ein kolorektales Karzinom zu entwickeln ist für UC Patienten 2,4-mal höher im Vergleich zu einer gesunden Kontrollpopulation. Das Risiko scheint durch 5-Aminosalicylate gesenkt zu werden [72]. 5-ASA interferiert nicht nur mit den TNFα und TGFβ Signalwegen [73], sondern auch mit der wnt/ β-catenin Achse, die nachweislich an der Entstehung von kolorektalen Karzinomen beteiligt ist [74, 75]. Außerdem fangen 5-ASA reaktive Sauerstoffradikale (ROS) ab [73].

4.3 Immunologie

4.3.1 Die Rolle der angeborenen Immunantwort

Die angeborene Immunantwort ist die erste Reaktion des Körpers auf eindringende Pathogene. Die Abwehrreaktion erfolgt sofort, ist aber unspezifisch. Neben der zellulären Komponente wird auch die mechanische Barriere durch die Mukusschicht und die Enterozyten zu diesem System gezählt (siehe: Pathogenese und Abb.3). Organe wie der Darm und die Haut halten durch ihren intensiven Kontakt mit der Außenwelt ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Toleranz und Immunreaktion. Im sogenannten *steady state* hält das System die Balance vor allem durch regulatorische T-Zellen, *tissue resident*-Makrophagen und dendritische Zellen. Diese Zellen zeigen eine sehr hohe Toleranz und haben eine inhibitorische Wirkung auf Effektorzellen. Sie haben eine lange Lebensdauer im Gewebe und sind meistens unfähig in die lokalen Lymphknoten auszuwandern, da ihnen die entsprechenden Rezeptoren fehlen.

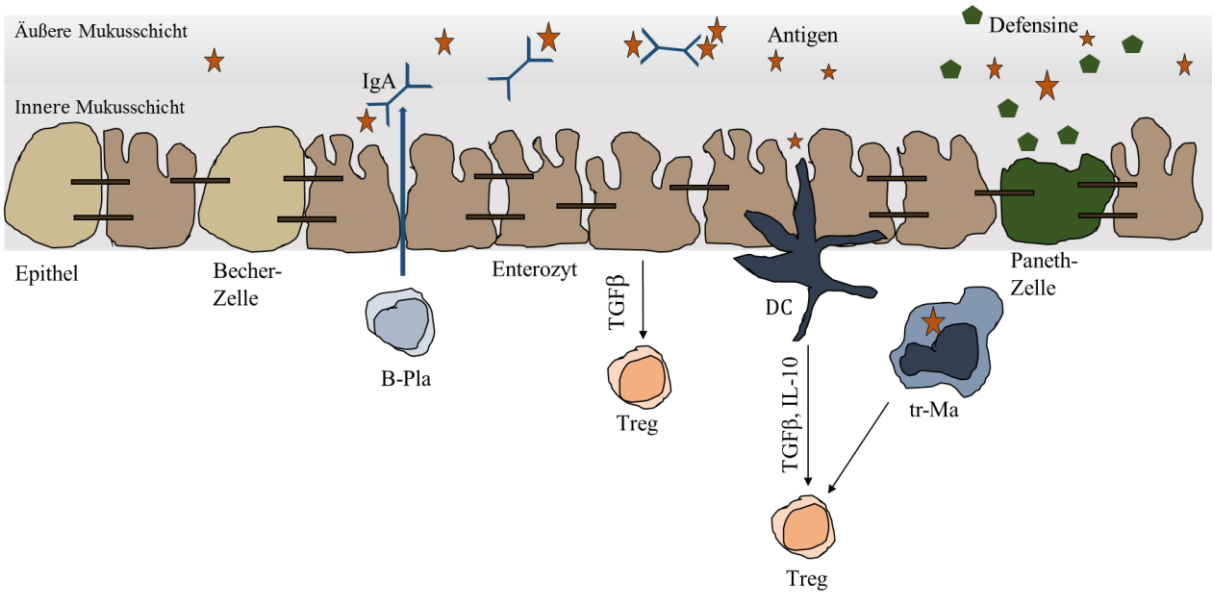


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Vorgänge im steady state.
IgA, das von Plasmazellen (B-Pla) produziert wird, opsoniert den Großteil der eindringenden Antigene. Paneth-Zellen sezernieren Defensine, Lysozyme und Phospholipase, die ebenfalls der Abwehr intestinaler Bakterien dienen. Enterozyten sezernieren im steady state TGFβ und tragen zur Polarisierung von regulatorischen T-Zellen (Treg) bei. Dendritische Zellen (DC) treten über intraluminale Dendriten mit Bakterien und anderen Antigenen in Kontakt. Unter steady state Bedingungen erfolgt auf die Bindung der Antigene nur die Ausschüttung von TGFβ und IL-10, das zur Ausbildung von inhibitorischen Zellen (Treg) führt. Wenn tissue resident-Makrophagen (tr-Ma) ein Antigen oder Zelldebris phagozytieren kommt es ebenfalls, über die Ausschüttung von IL-10 und TGFβ, zur Bildung von Treg.

Verschiebt sich das Gleichgewicht durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in Richtung Entzündung, wandern inflammatorische Zellen chemotakisch aus dem Blut ein. Die eingewanderten Zellen gehören zwar zum selben Zelltyp, unterscheiden sich phänotypisch und in ihrer Funktion aber sehr stark von den *tissue resident Zellen*.

An der angeborenen Immunreaktion sind eine ganze Reihe von Zellen beteiligt, zu denen neben den Epithelzellen im Darm auch neutrophile Granulozyten (nGr), dendritische Zellen (DC), Monozyten (Mo), Makrophagen (Ma) und natürliche Killerzellen (NKT) gehören [76]. Die Reaktion beginnt damit, dass ein TLR oder ein NLR ein passendes Antigen erkennt [34]. Nach Bindung der passenden Liganden wird die Reaktion an NF-κB weitergegeben [77]. Durch die Aktivierung von NF-κB werden proinflammatorische Enzyme ausgeschüttet und antigenpräsentierende Zellen zur Reifung angeregt. Die Präsentation der phagozytierten Antigene durch MHC Moleküle führt zur T-Zell Aktivierung und ist damit die Schnittstelle zur adaptiven Immunantwort [78, 79].

Monozyten und Makrophagen

Im peripheren Blut des Menschen sind drei verschiedene Monozytenpopulationen beschrieben. Ihre Differenzierung wird in Abbildung 4 grafisch dargestellt. Klassische $CD14^{hi}CD16^{-}$ Monozyten, die vor allem im Blut vorhanden sind und durch die Expression von CCR2 ins Zielgewebe auswandern können, haben eine Hauptfunktion als inflammatorische Monozyten. Sie exprimieren außerdem CCR4.

Die zweite Population im Blut sind $CD14^{+}CD16^{+}$ Monozyten. Diese Zellen exprimieren in größerem Umfang MHC II an ihrer Oberfläche und können *in vitro*, im Beisein von GM-CSF und IL-4, zu DC differenzieren [80]. Sie sind die Vorläufer für *tissue resident* Zellen im Darm.

Die dritte Monozytenpopulation kann keiner der ersten beiden Klassen zugeordnet werden. Sie exprimieren $CD14^{+}CD16^{+}$ und $CD64^{+}$. Charakterisiert man diese Zellpopulation weiter, zeigt sich eine hohe Expression an HLA-DR und CD86 und ein hohes Aktivierungspotenzial für T-Zellen, wie es normalerweise nur DC zeigen. Dennoch produzieren $CD14^{+}CD16^{+}CD64^{+}$ Zellen die gleichen Mengen an IFNγ und IL-12 wie Monozyten. Diese Zellen kombinieren also die Phänotypen und Funktionen von Monozyten und dendritischen Zellen. Das pathologische Potenzial dieser Zellen ist, durch die Kombination von T-Zellaktivierung bei gleichzeitiger Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, hoch [81].

Makrophagen gehören zu den Zellen mit der größten Plastizität. Sowohl ihr Phänotyp als auch ihre Funktion hängen vor allem von den umgebenden Zytokinen ab. Als *tissue resident*-Makrophagen haben sie eine sehr hohe Phagozytose-Aktivität und allein durch die immunologisch stille Phagozytose von Zelldebris, fremden Antigenen und Bakterien tragen sie einen großen Teil zum Erhalt des *steady state* im Darm bei [80]. Obwohl sie

Fremdantigene und apoptotische Zellen phagozytieren, schütten sie im *steady state* IL-10 und TGFβ aus um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern [82].

Der inflammatorische Makrophage exprimiert CCR2, CCR4 und $CD14^{hi}$. Je nach Aktivierungsweg hat dieser Makrophage unterschiedliche Funktionen. Eine Aktivierung über den TLR führt zu einer erhöhten mikrobiellen Phagozytosekapazität, sowie der Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-23 und TNFα. Erfolgt die Aktivierung über IFNγ und Lipopolysaccharid (LPS) wird die antigenpräsentierende Kapazität gesteigert. Dies führt zu einer vermehrten Expression von MHC II auf der Oberfläche, der Aktivierung zum M1-Makrophagen und der Polarisierung von Th1-Zellen [80].

Eine alternative Aktivierung ist durch die Bindung von IL-4 und IL-13 möglich. IL-4/13 aktivierte Makrophagen exprimieren vermehrt CD206 [80]. Makrophagen, die den Mannoserezeptor CD206 tragen gehören zum Wundheilungsprozess. Sie regen die Teilung von basalen Stammzellen als Reaktion auf eine epitheliale Verletzung über den wnt-1 Signalweg an [83].

In der Wundheilung beseitigen $CD206^{+}$ Makrophagen epithelschädigende Enzyme (Myeloperoxidasen, Granzyme, Defensine), die während der Abwehrreaktion von neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet werden [84].

Makrophagen und Monozyten können außerdem den *Scavenger* Rezeptor CD163, der $Gram^{+}$ und $Gram^{-}$ Bakterien erkennt, exprimieren. Obwohl man früher dachte, dass CD163 vor allem auf M2-Makrophagen exprimiert wird weiß man mittlerweile, dass CD163 auf fast allen Makrophagen zu finden ist [85]. Wenn diese Makrophagen aktiviert werden wird CD163 durch Metalloproteasen abgespalten. Lösliches CD163 kann im Serum als Marker der Makrophagenaktivierung gemessen werden und ist im Serum von UC und Morbus Crohn Patienten erhöht. Nach Behandlung mit einem TNFα Inhibitor sinkt der Plasmaspiegel von löslichem CD163. Ein Teil der Makrophagen im Darm trägt CD14, den LPS Rezeptor, an der Oberfläche und reagiert auf Stimulation durch Lipopolysaccharid mit der Ausschüttung von TNFα [86].

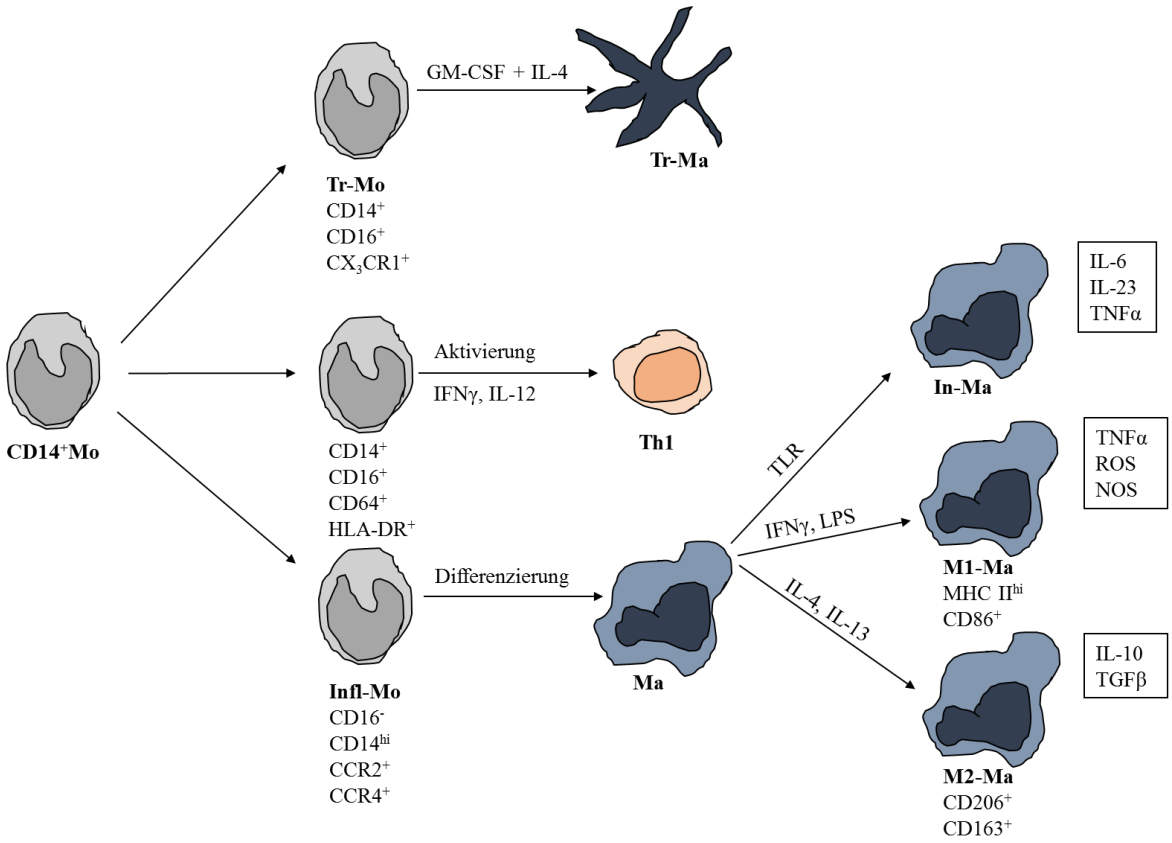


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Monozyten- und Makrophagendifferenzierung. $CD14^+$ Monozyten zirkulieren im Blut und haben unterschiedliche Phänotypen und Funktionen. Vorläufer von tissue resident Zellen (Tr-Mo) können über den Einfluss von GM-CSF und IL-4 die Funktion von tissue resident-Makrophagen und DC (Tr-Ma) einnehmen. Inflammatorische Monozyten (Infl-Mo) wandern ins Zielgewebe aus und differenzieren durch TLR Aktivierung zu Innate Makrophagen (In-Ma). Durch IFNγ oder LPS entstehen M1 Makrophagen. Durch den Einfluss von IL-4 und IL-13 entstehen M2 Makrophagen. $CD64^+CD14^+$ Monozyten können durch IFNγ und IL-12 direkt T-Zellen aktivieren und polarisieren in Richtung einer Th1 Reaktion.

Dendritische Zellen

Dendritische Zellen befinden sich sowohl in der Darmschleimhaut als auch in zugehörigen Lymphorganellen. Direkt im Epithel befinden sich vor allem $CD11b^+CD103^+$ DC. Sie haben eine Sentinelfunktion, binden pathogene Antigene, regulieren die Reifung anderer Zellen und wandern in sekundäre Lymphorgane aus um die Antigene den dortigen T- und B-Zellen zu präsentieren [87]. Unter normalen Bedingungen produzieren DC in der Lamina propria TGFβ und Rentinsäure, die Th0 Zellen über Foxp3 zu Tregs polarisiert [88] und die Plasmazelldifferenzierung in Richtung IgA-Produktion vorantreibt [89].

CD1a

CD1a ist ein Oberflächenglykoprotein, das in seiner Struktur MHC I ähnelt. Zellen, die CD1a exprimieren, präsentieren Lipidantigene an T-Zellen. CD1a wird vor allem von dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen in der Haut exprimiert [90].

Es ist beschrieben, dass $CD1a^+$ Zellen in der Haut Lipide an autoreaktive T-Zellen präsentieren und diese dadurch aktivieren können [91]. Ebenso können Bienengifte, die Phospholipase A2 (PLA_2) enthalten und damit Lipide abspalten, $CD1a^+$ Zellen aktivieren [92]. Im Wundheilungsprozess wird PLA_2 von neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet. Eine Quelle von Lipiden könnten Mikrovesikel von neutrophilen Granulozyten sein, die Lipidmediatoren enthalten, die physiologisch an der Auflösung einer Entzündung beteiligt sind [93]. $CD1a^+$ Zellen könnten somit eine Rolle in der Vermittlung einer möglichen Autoimmunität spielen.

4.3.2 Die Rolle der adaptiven Immunantwort

Im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort ist die erworbene Immunantwort hochspezifisch und braucht wesentlich länger bis zur ersten Reaktion. Zur adaptiven Immunantwort gehören T- und B-Zellen. T-Zellen können zunächst in $CD4^+$ T-Helferzellen und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen eingeteilt werden. $CD4^+$ Zellen vermitteln zwischen B- und T-Zellen und haben je nach Zytokinumgebung und den dadurch aktivierten oder unterdrückten Transkriptionsfaktoren verschiedene Funktionen. Die unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren und Zytokine unterscheiden naive $CD4^+$ Zellen (oder Th0 Zellen) von Th1-, Th2-, Th17- und regulatorische T-Zellen. Eine Übersicht über die T-Zelldifferenzierung und die ausgeschütteten Zytokine ist in Abbildung 5 gezeigt. Zytotoxische $CD8^+$ Zellen zeichnen sich durch eine hohe Expression an IFNγ, Granzym und Perforin aus [94].

Lange Zeit ging man davon aus, dass es ich bei UC um eine Th2 und IL-13 vermittelte Erkrankung handelt, während Morbus Crohn vor allem durch Th1-Zellen, IL-12 und IFNγ vermittelt wird [95]. Es häufen sich aber Veröffentlichungen, die diese strikte Trennung in Frage stellen. So produzieren *in vitro* sowohl Zellkulturen von UC-Biopsien als auch von CD-Patienten sehr hohe Mengen an IFNγ [96]. In einer anderen Studie wurde in Zellkulturen von UC-Biopsien sogar weniger IL-13 nachgewiesen als in CD-Kulturen und gesunden Kontrollen [97].

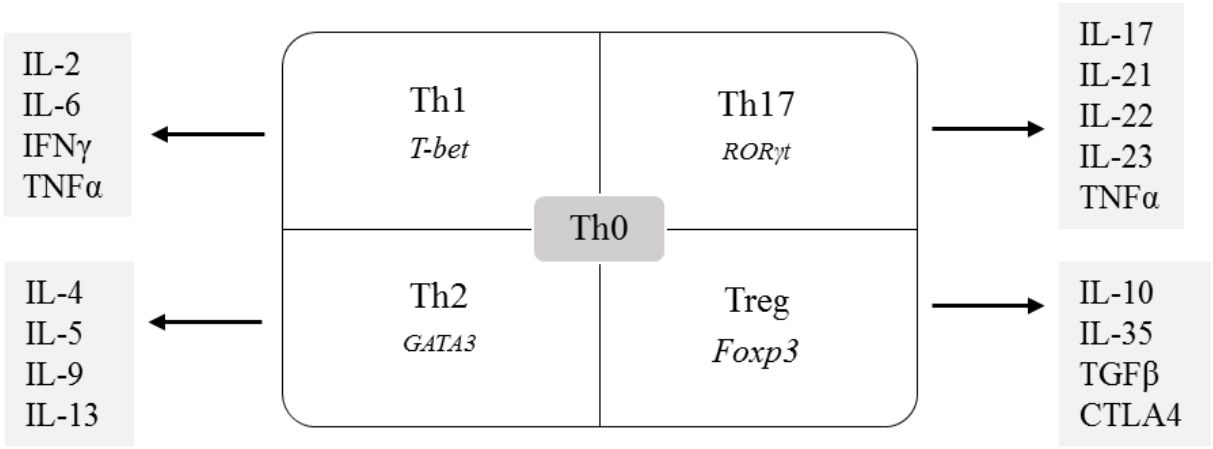


Abbildung 5: Schematische Darstellung der T-Zelldifferenzierung.

Th1

Th1 Zellen eliminieren intrazelluläre Pathogene wie Bakterien und Viren. Aktivierte Makrophagen und dendritische Zellen exprimieren IL-12, das dann STAT4, das Gen für IFNγ, und den Transkriptionsfaktor T-bet aktiviert. T-bet ist für die Polarisierung von Th0-Zellen zu Th1-Zellen verantwortlich [98, 99]. Th1-Zellen sind durch die Ausschüttung der Zytokine IFNγ und IL-2 gekennzeichnet. Das ausgeschüttete IFNγ triggert Makrophagen wiederum zur Bildung von TNFα. TNFα Rezeptoren aktivieren nach Bindung von TNFα den Kernfaktor NF-κB. Es kommt zu multiplen entzündlichen Effekten: erweiterte Angiogenese, Paneth-Zell Sterben, Makrophagenaktivierung und die direkte Schädigung von Enterozyten. [35]. Ein weiterer Effekt von TNFα ist die Umwandlung von stromalen Zellen zu Myofibroblasten und deren Produktion von Metalloproteinasen [100]. Dabei handelt es sich um verschiedene gewebezerstörende Enzyme, die durch die Zerstörung der Basalmembran die Apoptose von Enterozyten auslösen können [101]. TNFα wird nicht nur von T-Zellen, sondern auch von $CD14^+$ Makrophagen, Adipozyten und Fibroblasten produziert [102].

Th2

Th2 Zellen dienen primär der Abwehr von Parasiten. IL-4 aktiviert die STAT6 Signalkaskade, die den Transkriptionsfaktor GATA3 aktiviert. Neben IL-4 sezernieren Th2 Zellen auch IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 und IL-25 [94]. IL-13 und IL-4 binden beide an die IL-4Rα1 Untereinheit. Die IL-4Rα1 Kette bildet bei alleiniger Bindung von IL-4 einen Komplex mit der IL-4Rγ Kette. Durch diesen Komplex kommt es über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Januskinase 1 und 3 zur Polarisierung von Th0- zu Th2-Zellen. Liegen IL-4 und IL-13 gemeinsam vor bildet die IL-4Rα1 Kette einen ternären Komplex mit der IL-13Rα Kette [103]. Über die Aktivierung der Januskinase 1 und der Tyrosinkinase 2 kommt es zur pathologischen Manifestation, die sich in einer erhöhten Mukusproduktion, Fibrose und der Ausschüttung von IgE und proinflammatorischen Zytokinen zeigt (siehe Abb.6) [104]. In einer Tierstudie von Fichtner-Feigl *et al.* konnte gezeigt werden, dass der IL-4/ 13 Signalweg

maßgeblich an der Entstehung der Gewebefibrose beteiligt ist [105]. IL-5 spielt eine Rolle in der Migration und Differenzierung von eosinophilen Granulozyten [106]. Außerdem sezernieren Th2 Zellen IL-10, das der Unterdrückung einer gegenläufigen Th1-Polarisierung dient und zudem eine regulatorische Funktion hat [94].

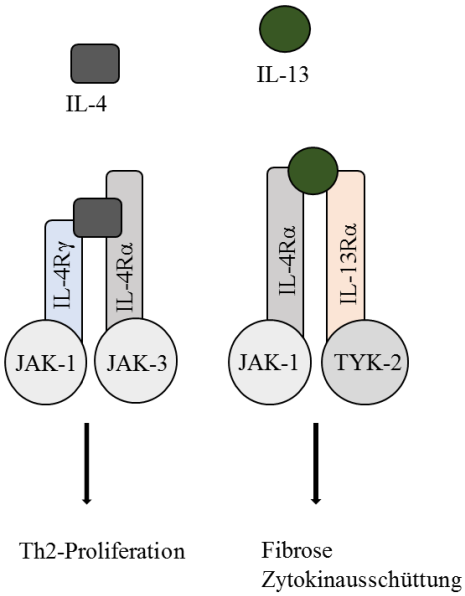


Abbildung 6: Darstellung der IL-4/ 13 Kaskade. IL-4 und IL-13 teilen die IL-4Rα Kette als gemeinsamen Rezeptor. Bindet IL-4 an die IL-4Rα Kette bildet sich ein Komplex mit IL-4Rγ. Über die Aktivierung der Januskinase 1 und 3 (JAK-1/ 3) kommt es zur Th2 Proliferation. Bindet IL-13 an die IL-4Rα Kette bildet sich ein Komplex mit IL-13Rα. Über die Aktivierung der Januskinase 1(JAK-1) und der Tyrosinkinase 2(TYK-2) kommt es zur pathologischen Manifestation, die sich in einer erhöhten Mukusproduktion, Fibrose und der Ausschüttung von IgE und proinflammatorischen Zytokinen zeigt.

Die IL-4/ 13 Signalkaskade kann durch den Einsatz funktionsloser IL-4 Mutanten blockiert werden. Eine solche Mutante ist Pitrakinra. Es handelt es sich um ein 15 kDa schweres, rekombinantes humanes Interleukin 4. An Position 121 wurde Arginin zu Asparaginsäure und an Position 124 Tyrosin zu Asparaginsäure mutiert. Pitrakinra bindet an die IL-4Rα Kette und blockiert die Bildung eines Komplexes mit der IL-4Rγ Kette oder der IL-13Rα Kette. [107]. Pitrakinra hat bereits in einer klinischen Phase II Studie die Wirksamkeit in Patienten, die unter Asthma leiden, bewiesen [108].

Th17

Th17-Zellen sind an der Immunantwort auf extrazelluläre Bakterien und Pilze beteiligt. Damit spielen sie eine besondere Rolle in Organen wie dem Darm oder der Haut, die konstanten Kontakt zu extrazellulären Mikroorganismen haben. Ihre Differenzierung unterliegt der Kontrolle von RORα und RORγ, die beide durch STAT3 aktiviert werden. Die Aktivierung von STAT3 ist dabei abhängig von TGFβ, IL-6 und IL-21 [109]. Th17-Zellen sezernieren IL-17, IL-21, IL-22 und TNFα. Im Serum von Patienten mit klinisch aktiver UC sind diese Zytokine im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht [110, 111].

Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Treg) sind charakterisiert durch die Expression von Foxp3. Man unterscheidet natürliche nTreg, die bereits während der Thymusentwicklung induziert werden, von induzierten iTreg, die in der Peripherie im Beisein von TGFβ aus naiven $CD4^+$ Zellen gebildet werden können. Der Transkriptionsfaktor zur Bildung von iTreg ist neben Foxp3 auch RORγ und eben dieser ist auch maßgeblich an der Polarisierung von Th17-Zellen beteiligt. In Anwesenheit von IL-21 wird Foxp3 unterdrückt und durch RORγ können anstatt iTreg Th17 Zellen gebildet werden [112]. Treg inhibieren Effektorzellen über die Expression von CTLA-4 und die Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10, IL-35 und TGFβ [113].

4.3.3 Zytokine und Chemokine

TGFβ

TGFβ (*transforming growth factor*) gehört zur Gruppe der Wachstumsfaktoren und spielt eine wichtige Rolle während der Embryogenese und im Wundheilungsprozess. Im adulten Organismus reguliert TGFβ die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen. In der T-Zell Differenzierung induziert TGFβ über Foxp3 regulatorische T-Zellen und trägt damit zur Kontrolle des Immunsystems im Darm bei [114]. Dies wird besonders deutlich, wenn man Mäuse mit einem Knockout auf dem Gen für TGFβ untersucht. Ihnen fehlen aktive Treg und die fehlende Suppression von antigen-präsentierenden Zellen und T-Effektorzellen führt dazu, dass diese Tiere spontan Kolitis entwickeln [115]. Außerdem spielt TGFβ eine Rolle bei der Entstehung der Gewebefibrose [105].

TARC

TARC (*thymus and activation-regulated chemokine*, Synonym: CCL17) ist ein Chemokin, das über STAT6 induziert wird und Th2-Zellen anlockt. Die Expression von TARC im Darm ist dabei 20-fach erhöht bei Patienten mit aktiver UC im Vergleich zu gesunden Kontrollen [116]. In einer Studie, die das immunologische Profil von 42 UC Patienten mit dem Profil von 31 gesunden Spendern verglich konnte gezeigt werden, dass UC Patienten mit hoher klinischer Aktivität (akuter Schub) einen signifikant höheren TARC Serumspiegel haben als UC Patienten in Remission. (Paper in Review, Föhlinger *et al.*, 2016 [117])

HGF

HGF (*hepatocyte growth factor*) ist ein Wachstumsfaktor aus der Plasminogen Familie. Er wird vor allem von mesenchymalen Zellen produziert. Durch HGF werden die epitheliale Proliferation während der Embryogenese und verschiedene Wundheilungsprozesse im adulten Organismus gesteuert. Der Rezeptor für HGF ist c-Met [118]. Die Effektor Funktionen von HGF sind vielfältig. Während einige Autoren HGF eine protektive Funktion zuschreiben, gibt es Arbeiten, die HGF eine stark proinflammatorische Rolle in der Monozyten- und Makrophagenregulation zuweisen. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass HGF die Antigenpräsentation auf Monozyten stimuliert [119]. Die Aktivierung von c-Met führt außerdem zur Polarisierung von M1-Makrophagen [120]. Makrophagen selbst können ebenfalls HGF produzieren [121].

4.3.4 Inflammatorische Stadien

Eine akute Entzündung ist die Reaktion des Körpers auf eine Gewebeverletzung und dient dem Selbstschutz. An dieser akuten Reaktion sind vor allem angeborene Immunzellen, sowie Th1-Zellen, M1-Makrophagen und zytotoxische T-Zellen beteiligt [122].

Um die Gewebeverletzung zu minimieren muss eine akute Entzündungsreaktion streng reguliert sein [123]. Die Auflösung einer akuten Entzündung ist ein aktiver Prozess, an dem verschiedene Faktoren beteiligt sind. Aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren entstehen durch das Enzym Lipooxygenase anti-inflammatorische Lipidmediatoren, wie Lipoxin A_4, Resolvine und Protectine. Sie limitieren den Einstrom von neutrophilen Granulozyten und vermitteln eine verstärkte Phagozytose des Zelldebris und der apoptotischen Zellen durch Makrophagen (Efferozytose) [124]. Efferozytose führt im Makrophagen unter normalen Umständen zu einem regulatorischen Phänotyp, der Tregs etabliert und dazu führt, dass es nicht zu einer überschießenden Immunreaktion kommt [93, 125]. Diese zweite Phase der Entzündung wird von Th2-Zellen, M2-Makrophagen, Tregs, IL-10, TGFβ und einer chronischen Ummodellierung des Gewebes geprägt.

4.3.5 Übersicht über die immunologischen Vorgänge

Die immunologischen Vorgänge, die zur pathologischen Manifestation einer UC führen, werden in Abbildung 7 dargestellt.

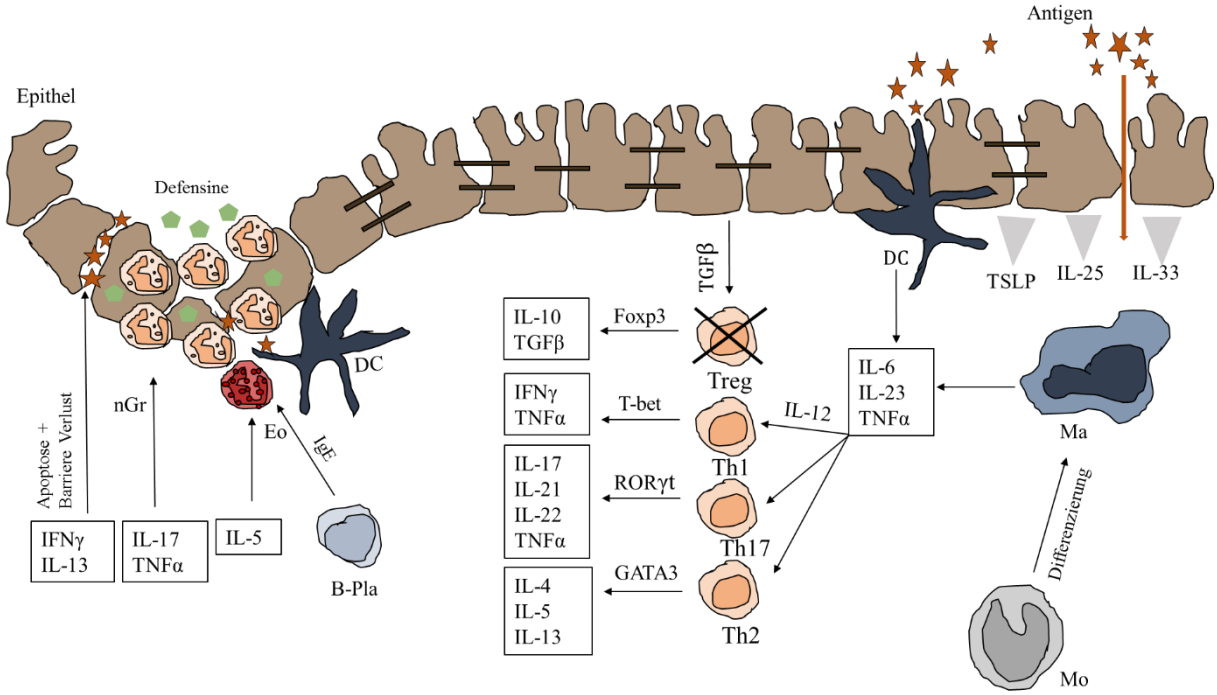


Abbildung 7: Schematische Darstellung der immunologischen Vorgänge und der pathologischen Manifestation einer UC.
Dendritische Zellen (DC) und Makrophagen (Ma) erkennen via TLR ein Antigen und es kommt zur Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-23 und TNFα. Diese unterdrücken regulatorische T-Zellen (Treg) und fördern die Polarisierung von Th1, Th2 und Th17 Zellen. Das, von Th2 Zellen ausgeschüttete, IL-13 führt zur Apoptose der intestinalen Zellen und zur Zerstörung der tight junctions. Im Bereich der defekten tight junction können weitere Antigene in die Lamina propria eindringen und die oben beschriebene Abwehrreaktion verstärken. Durch IL-17 und TNFα werden neutrophile Granulozyten (nGr) angelockt, die durch das Freisetzen von Defensinen den Epithelschaden weiter verschlimmern. Es kommt zu Kryptenabszessen und Ulzerationen. IL-5 lockt eosinophile Granulozyten (Eo) ins Gewebe, die nach Kontakt mit IgE, das durch Plasmazellen (B-Pl) produziert wird, degranulieren. Ma, Mo, DC können nicht nur über TLR aktiviert werden, sondern auch durch IL-25, IL-33 und TSLP, die vom geschädigten Epithel ausgeschüttet werden.

4.4 Tiermodelle in der Erforschung von Colitis ulcerosa

Die Komplexität immunologischer Erkrankungen kann *in vitro* nicht wiedergegeben werden und die ersten Berichte über eine erfolgreiche Etablierung einer Kolitis in einem Versuchstier gehen auf Ohkusa *et al*., 1985 zurück [126]. Die größtmögliche Homologie zur Erkrankung des Menschen wäre in Versuchen mit Tamarin Affen zu erwarten. Tamarin Affen entwickeln spontan eine chronischen Kolitis, welche einer UC ähnelt [127]. Aus ethischen Gründen ist für ein Tiermodell die Spezies zu wählen, die am niedrigsten entwickelt ist, aber den Versuchszweck erfüllen kann. Die Embryogenese und die Funktionen des Mäusedarms sind verhältnismäßig ähnlich zu der des Menschen und vergleichende Genomstudien zeigen, dass Mensch und Maus ca. 80% der Gene teilen [128]. Zu beachten ist, dass verschiedene Mausstämme sehr unterschiedlich auf denselben Versuchsaufbau reagieren. So reagieren zum Beispiel C3HeJ und BALB/c Mäuse auf einen Trigger mit 2,4,6 Trinitrobenzensulfon Säure (TNBS) mit starken intestinalen Läsionen während C57BL/6 Mäuse unter denselben Bedingungen kaum Reaktionen zeigen [129]. Ähnliches gilt für eine Dextransulfat (DSS) induzierte Kolitis [130]. Zur Etablierung einer experimentell induzierten Kolitis sind im Wesentlichen die folgenden Protokolle etabliert (siehe Tab.1) [131]:

4.4.1 DSS – Kolitis

Eine durch DSS ausgelöste Kolitis ist sehr variabel was die Art und den Schweregrad der Entzündung angeht. DSS wird über das Trinkwasser oder rektal verabreicht. Das Verabreichen einer 1-5% Lösung für eine Woche führt zu einer schweren akuten Entzündung, während eine zyklische Verabreichung für eine Woche mit anschließender zweiwöchiger Pause zu einer chronischen Kolitis führt [129]. DSS ist ein starkes chemisches Irritans und zerstört die epitheliale Barriere. Durch den plötzlichen Kontakt der Lamina propria mit Antigenen aus dem Lumen des Darms kommt es zu einer erhöhten Produktion der proinflammatorischen Zytokine INFγ, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12 und TNFα während der akuten Phase. In der chronischen Krankheitsphase werden später auch IL-4, IL-5 exprimiert [132]. Die Variabilität zwischen den Tieren in diesem Modell ist hoch [129]. Wenn man jedoch dieselbe Spezies verwendet, ist der Schweregrad in Abhängigkeit von der Dosis planbar [133].

4.4.2 TNBS – Kolitis

TNBS wird verwendet um eine akute Kolitis auszulösen. Die Reaktion des Immunsystems beruht auf der haptenisierenden Wirkung von TNBS. Bei einem Hapten handelt es sich um ein unvollständiges Antigen, das eine Immunreaktion auslösen kann sobald es an ein körpereigenes Trägerprotein gebunden ist [134]. TNBS muss zur Anwendung in Ethanol gelöst werden und neben der haptensierenden Wirkung von TNBS ist Ethanol ein Irritans und kann über die Denaturierung von Proteinen die Epithelzellen schädigen [135]. Die akute Immunantwort beginnt mit einer Th1-vermittelten Reaktion, die sich mit fortschreitender Chronizität in Richtung einer Th17 Reaktion entwickelt. Nach 8-9 Wochen kann dann auch ein deutlicher Anstieg von IL-13 gemessen werden [105].

4.4.3 Oxazalon – Kolitis

Oxazalon gehört wie TNBS zu den haptenisierenden Molekülen und löst eine akute Reaktion aus. Es zeigen sich dabei sehr schnell Strukturveränderungen im Darm und das histologische Bild ist mit Ulzerationen, Ödemen, Blutungen und Kryptenatrophie dem histologischen Bild des Menschen sehr ähnlich. Die Sterblichkeit während der akuten Phase ist hoch und es sind kaum Anwendungsformen beschrieben, die zu einer chronischen Ausprägung der Kolitis führen [136]. Die ausgelöste Immunreaktion wird von Il-4, IL-5 und IL-13 dominiert [136].

Tabelle 1: Übersicht der Tiermodelle zur experimentell ausgelösten Kolitis und der beteiligten nachgewiesenen immunologischen Vorgänge.

Substanz	Immunologie	Symptome
DSS	⬆ INFγ, IL-6, TNFα, IL-4, IL-5 Th1 und Th2 [130]	UC
TNBS	⬆ IL-12, TNFα, IFNγ Th1 und Th17 [137]	CD
Oxazalon	⬆ IL-4, IL-5, IL-13 Th2 [136]	UC, Akut

In früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe hat sich gezeigt, dass das Auslösen einer Kolitis mit Oxazalon in humanisierten NOD-Scid IL2Rγ-chain^{null} Mäusen zu einer sehr hohen Sterblichkeit führte. Da Oxazalon in Ethanol gelöst werden musste, wurde in einer Kontrollgruppe die Applikation von Ethanol ohne Oxazalon durchgeführt. In dieser Gruppe kam es zu einer milderen Form der Kolitis, die mit einer wesentlich geringeren Sterblichkeit

einherging. Ethanol ist somit zur Auslösung einer Kolitis in NOD-Scid IL2Rγ-chain^{null} Mäusen besser geeignet als Oxazalon. In derselben Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die Ausprägung der Kolitis stark vom Spender abhängig ist. Tiere, die mit den PBMC eines gesunden Spenders rekonstituiert wurden entwickelten keine Kolitis [138].

4.5 NOD-scid IL2Rγ^{null} Mäuse

Bereits 1962 entdeckten Issac und Cattanach Nacktmäuse, die durch einen Thymusdefekt keine funktionsfähigen T-Zellen entwickeln. 1983 folgte dann die C.B-17-Prkdcscid (Scid) Maus, die durch Defekte in T- und B-Zellrezeptor keine funktionierenden T- und B-Zellen haben. Greiner *et al.* konnten 2005 einen Mausstamm etablieren, der weder über funktionierende Lymphozyten, noch über NK-Zellen verfügt.

Die IL2Rγ-Kette wird für die Signalwege sechs verschiedener Rezeptoren hämatopoetischer Zellen benötigt [139]. Der Verlust dieses Gens führt also zum Ausfall des gesamten angeborenen und adaptiven Immunsystems. Mäuse der NOD-Scid IL2Rγ^{null} Linie sind hervorragend dazu geeignet humane Zellen anzunehmen und entwickeln erst spät eine Abstoßungsreaktion im Sinne einer *graft versus host disease*. Histologisch zeigen NOD-Scid IL2Rγ^{null} Mäuse eine Depletion von Lymphozyten in allen lymphatischen Geweben. Der Thymus von NOD-Scid IL2Rγ^{null} Mäusen besteht hauptsächlich aus stromalen Zellen und enthält keinerlei mononukleären Zellen. In der Milz ist keine klare Milzstruktur mit den typischen Follikeln zu erkennen. Die Lymphknoten sind hypoplastisch und enthalten kaum Immunzellen. Im Serum der Tiere ist kein Immunglobulin messbar. In der FACS Analyse können keinerlei NK-Zellen nachgewiesen werden. Nach Stimulierung durch ein Immunstimulans (*polyinosinic-polycytidylic*, das mit TLR3 interagiert) können in der Milz sehr wenige Zellen mit NK-Oberflächenmarkern nachgewiesen werden. Analysiert man *in vitro* die dendritischen Zellen aus dem Knochenmark von NOD-Scid IL2Rγ^{null} Mäusen stellte man fest, dass diese Zellen kein TNFα produzieren und auch nicht den Reifungsmarker CD86 exprimieren. *In vitro* ist weder IL-12 noch IFNγ nachweisbar und die vorhandenen DC verbleiben damit ohne Funktion. In der Milz von Tieren, die mit humanen Stammzellen rekonstituiert wurden, sind humane Immunglobulin produzierende B-Zellen, NK-Zellen, myeloide Zellen, dendritische Zellen und Stammzellen nachweisbar. Außerdem können sich in diesem Modell humane T-Zellen vermehren. NOD-Scid IL2Rγ^{null} Mäuse werden im Durchschnitt 89 Wochen alt und im Gegensatz zu Mäusen der Linie NOD-Scid entwickeln sie keine von Thymusgewebe-ausgehenden Lymphome [140].

5 FRAGESTELLUNG UND ZIELE

5.1 Fragestellung

Mehrere Autoren haben beschrieben, dass die Reproduzierbarkeit von Studien zur Erforschung neuer Therapieansätze mit *biologicals* und *small molecules* schwach ist [141, 142]. Die Übertragung der Effekte in eine klinische Phase II Studie ist dabei noch wesentlich komplexer als die Reproduzierbarkeit von *in vitro* Studien in das entsprechende Tiermodell. Viele Wirkstoffe scheitern nach *proof of concept* im Tiermodell in einer klinischen Phase II Studie im Patienten [143]. Gerade die fein modulierte Immunantwort kann speziesspezifisch sein und Aktivierungskaskaden können im Menschen und in der Maus unterschiedlich sein. Darüber hinaus können biologische Therapeutika, die hoch spezifisch für den Menschen sind, nicht in der Maus getestet werden. Standardisierte Mäuse unterscheiden sich von der heterogenen Patientenpopulation mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund, Manifestationen und den vielfältigen Auslösern [144]. Eine Verbesserung könnten hier Mäuse mit humanisiertem Immunsystem bringen, welche die inflammatorische Situation im Menschen abbilden und damit eine Grundlage für die Testung neuer Medikamente schaffen.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst geklärt werden ob sich durch die rektale Gabe von 50 % Ethanol an Mäuse mit humanisiertem Immunsystem eine stabile Kolitis etablieren lässt, die durch humanspezifische Wirkstoffe beeinflusst werden kann. Um genauer aufzuzeigen welche Mechanismen der ausgelösten Kolitis zu Grunde liegen, wurden in einer Versuchsgruppe die Th1-Polarisierung mit einem TNFα Inhibitor unterbunden und das immunologische Profil in Zusammenhang mit der klinischen Aktivität untersucht. In einer anderen Versuchsgruppe sollte mit einem IL-4/ 13 Inhibitor die Th2-Polarisierung blockiert und das immunologische Profil in Zusammenhang mit der klinischen Aktivität untersucht werden.

Danach sollte geklärt werden, ob das Tiermodell die immunologischen Vorgänge der UC im Patienten widerspiegeln kann. Dazu sollte ein immunologisches Profil aus peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) und den Lamina propria Zellen (LPMC) des entzündeten Kolons von Patienten mit UC erstellt werden. Das Profil soll dann mit dem immunologischen Profil, das aus der Milz der Mäuse im Tiermodell erstellt wurde, verglichen werden.

5.2 Ziele

1. **Ziel I.** Etablierung einer Kolitis in NOD-Scid IL2Rγ-chain^{null} Mäusen mit humanisiertem Immunsystem durch die rektale Applikation von Ethanol.

   1.1. Hypothese: Das Auslösen einer Kolitis mit Ethanol führt zu einer Erhöhung des klinischen Aktivitätsscores im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

   1.2. Hypothese: Das Auslösen einer Kolitis mit Ethanol führt zu einer Erhöhung des makroskopischen Scores des Kolons im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

   1.3. Hypothese: Das Auslösen einer Kolitis mit Ethanol führt zu einer Erhöhung des histologischen Scores des Kolons im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

   Methode 1: Feststellung und Vergleich des klinischen, histologischen und makroskopischen Score in einer Ethanol-behandelten Gruppe und einer unbehandelten Kontrollgruppe.

   1.4. Hypothese: Durch die rektale Gabe von Ethanol entwickeln mehr als 80% der Mäuse eine Kolitis, während die Kontrolltiere als gesund zu betrachten sind.

   Methode 1.4: Berechnen eines *Cut-off* Wertes zur Unterscheidung zwischen gesunden und kranken Tieren.

2. **Ziel II:** Charakterisierung der immunologischen Vorgänge in der Maus und im Mensch. Es soll eingeschätzt werden inwieweit die, im Tiermodell durch Ethanol ausgelöste, Kolitis der UC des Menschen entspricht.

   2.1. Hypothese: Das Auslösen einer Kolitis mit Ethanol führt zu einem erhöhten Anteil von $CD45^+$; $CD4^+$, $CD4^+CD44^+CD62L^+$, $CD8^+$, $CD8^+CD44^+CD62L^+$, $CD14^+$; $CD163^+CD14^+$; $CD64^+CD14^+$; $CD1a^+CD14^+$; $CD1a^+CD11b^+$ Zellen in der Milz der Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren.

   Methode 2.1: Vergleich der FACS-Analyse der Milz der Tiere in einer Ethanol + NaCl behandelten Gruppe und einer unbehandelten Kontrollgruppe.

   2.2. Hypothese: UC führt zu einem erhöhten Anteil von $CD14^+$; $CD163^+CD14^+$; $CD64^+CD14^+$, $CD1a^+CD14^+$; $CD1a^+CD11b^+$, $CD4^+$, $CD4^+CD44^+CD62L^+$, $CD8^+$, $CD8^+CD44^+CD62L^+$ Zellen im peripheren Blut der UC Patienten im Vergleich zu einer gesunden Population.

Methode 2.2: Vergleich der FACS-Analyse der peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) von UC-Patienten und einer gesunden Vergleichspopulation.

2.3. Hypothese: UC führt zu einem erhöhten Anteil von $CD14^+$; $CD163^+CD14^+$; $CD64^+CD14^+$, $CD1a^+CD14^+$; $CD1a^+CD11b^+$, $CD4^+$, $CD4^+CD44^+CD62L^+$, $CD8^+$, $CD8^+CD44^+CD62L^+$ Zellen in der Lamina propria des Kolons der UC Patienten im Vergleich zu einer gesunden Population.

Methode 2.3: Vergleich der FACS-Analyse der Lamina propria Zellen des Kolons (LPMC) von UC-Patienten und einer gesunden Vergleichspopulation.

3. Ziel III: Therapieeffekte durch einen TNFα Antikörper

3.1. Hypothese: Nach Auslösen einer Kolitis mit Ethanol wird ein niedrigerer klinischer Aktivitätsscore in der Gruppe, die mit Infliximab therapiert wird, im Vergleich zu einer NaCl-behandelten Gruppe erwartet.

3.2. Hypothese: Nach Auslösen einer Kolitis mit Ethanol wird ein niedrigerer makroskopischer Score des Kolons in der Gruppe, die mit Infliximab therapiert wird, im Vergleich zu einer NaCl-behandelten Gruppe erwartet.

3.3. Hypothese: Nach Auslösen einer Kolitis mit Ethanol wird ein niedrigerer histologischer Score des Kolons in der Gruppe, die mit Infliximab therapiert wird, im Vergleich zu einer NaCl-behandelten Gruppe erwartet.

Methode 3: Feststellung und Vergleich des klinischen, histologischen und makroskopischen Score in einer Ethanol + NaCl behandelten Gruppe, einer Ethanol + Infliximab behandelten Gruppe und einer unbehandelten Kontrollgruppe.

3.4. Hypothese: Das Auslösen einer Kolitis mit Ethanol führt zu einer Erhöhung der $CD4^+CD44^+CD62L^+$; $CD163^+CD14^+$; $CD64^+CD14^+$; $CD1a^+CD14^+$; $CD1a^+CD11b^+$ Zellen. Die Gabe eines TNFα Inhibitors senkt die Frequenz dieser Zellen.

3.5. Hypothese: Das Auslösen einer Kolitis mit Ethanol führt zu einer Erniedrigung der $CD8^+$ naiven Zellen. Die Gabe eines TNFα Inhibitors erhöht die Frequenz dieser Zellen.

Methode 3.4: Vergleich der FACS-Analyse der Milz der Tiere in einer Ethanol + NaCl-behandelten Gruppe, einer Ethanol + Infliximab behandelten Gruppe und einer unbehandelten Kontrollgruppe.

4. Ziel IV: Therapieeffekte durch einen IL-4 /13 Antikörper

4.1 Hypothese: Nach Auslösen einer Kolitis mit Ethanol wird ein niedrigerer klinischer Aktivitätsscore in der Gruppe, die mit Pitrakinra therapiert wird, im Vergleich zu einer NaCl-behandelten Gruppe erwartet.

4.2 Hypothese: Nach Auslösen einer Kolitis mit Ethanol wird ein niedrigerer makroskopischer Score des Kolons in der Gruppe, die mit Pitrakinra therapiert wird, im Vergleich zu einer NaCl-behandelten Gruppe erwartet.

4.3 Hypothese: Nach Auslösen einer Kolitis mit Ethanol wird ein niedrigerer histologischer Score des Kolons in der Gruppe, die mit Pitrakinra therapiert wird, im Vergleich zu einer NaCl-behandelten Gruppe erwartet.

Methode 4: Vergleich des klinischen, histologischen und makroskopischen Score in einer Ethanol + NaCl behandelten Gruppe, einer Ethanol + Pitrakinra behandelten Gruppe und einer unbehandelten Kontrollgruppe.

4.4 Hypothese: Durch die Gabe von Pitrakinra verändert sich das immunologische Profil der Tiere.

Methode 4.4: Vergleich der FACS-Analyse der Milz der Tiere in einer Ethanol + NaCl behandelten Gruppe, einer Ethanol + Pitrakinra behandelten Gruppe und einer unbehandelten Kontrollgruppe

6 MATERIAL UND METHODEN

6.1 Rekrutierung und Auswahl der Spender

Die Rekrutierung der Spender erfolgte in den Ambulanzen von Prof. Dr. S. Brand, Med. Klinik II, und Prof. Dr. Matthias Siebeck, Klinik für AVGT Chirurgie, im Klinikum der Universität München. Nach Aufklärung und Einverständnis der Spender wurden in Einklang mit dem Ethik-Votum 2015-22 der LMU München 60 ml Blut für die Rekonstitution der Mäuse entnommen.

Zur Rekonstitution der Mäuse wurden zwei Therapie-naive Spender (Patient 58 und Patient 59), ein TNFα-Inhibitor naiver Spender (Patient 65) und zwei TNFα-Inhibitor therapierte Spender (Patient 47 und Patient 70) ausgewählt. Für die immunologische Profilierung wurde in Einklang mit dem Ethik-Votum 2015-22 der LMU München von den Spendern jeweils 30 ml Blut entnommen.

6.2 Tierhaltung

Die Haltung der Mäuse erfolgte in der Zentralen Versuchstierhaltung der Chirurgischen Klinik der LMU München, Nussbaumstr. 20, 80336 München unter optimierten Hygiene-Bedingungen (OHB) und in individuell belüfteten Käfigen. Der Hygienestandard in diesem Bereich entspricht annähernd SPF-Bedingungen und wird nach Empfehlungen der FELASA überwacht. Alle Tierversuche erfolgten in Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz und wurden von der Regierung von Oberbayern unter den Aktenzeichen 55.2-2-1-54-25-32-65-11 und 55.2-2-1-54-2532-74-15 genehmigt.

6.3 Isolierung der PBMC für die Rekonstitution der Mäuse

Zur Isolierung der PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) für die Rekonstitution der Mäuse wurden 60 ml Blut in 10 ml S-Monovetten[*18] entnommen. Das entnommene Blut wurde im Verhältnis 1:2 mit Hanks Buffered Saline (HBSS)[*7] vermischt, und jeweils 30 ml der Mischung wurden in ein Leukosep-Röhrchen[*1] überführt. Leukosep-Röhrchen[*1] wurden vorher mit 15 ml Roti©-Sep 1077[*1] beladen. Die Zentrifugation erfolgte für 30 Minuten bei 400g und ohne Abbremsung. Nach Abnahme der Interphase wurden 30 µl im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau[*3] gemischt und in einer Neubauer Zählkammer[*1] die Zellzahl ermittelt. Die Zellzahl wurde auf eine Konzentration von $4 \cdot 10^6$ in 100 µl eingestellt. Von den übrigen Zellen

[*] Die Herstellerangaben befinden sich unter der fortlaufenden Nummer auf S.40

wurden 200 µl entnommen, auf 1 ml verdünnt und von dieser Verdünnung jeweils 100 µl mit 100 µl FACS-Färbung gefärbt.

6.4 Rekonstitution

Rekonstituiert wurden 6-8 Wochen alte NOD-Scid IL2Rγ-chain^{null} Mäuse, die von Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland bezogen wurden. Die Mäuse wurden in einem Restrainer fixiert und der Schwanz mit einer Infrarotlampe für 2 Minuten erwärmt bis die Venae caudalis dorsalis und mediana deutlich hervortraten. Die Injektion von 100 µl der Zellsuspension erfolgt mit einer 1 ml Insulin-BD Mikro-fine 0,33 mm·12,7 mm Spritze[*5] streng intravenös. Jede Maus erhielt $4 \cdot 10^6$ Zellen.

6.5 Versuchsgruppen

In allen Versuchen wurden 4 Tiere pro Behandlungsgruppe verwendet. Alle Tiere wurden an Tag 1 rekonstituiert. Eine Gruppe verblieb nach der Rekonstitution an Tag 1 unbehandelt als Kontrollgruppe.

- **Kontrollgruppe** (ohne Ethanol-Behandlung)

Die anderen Mäuse wurden zur Kolitis-Auslösung nach dem Schema in Abbildung 8 behandelt. Um die Wirkung der Medikamente auf die Kolitis zu vergleichen, erhielt eine Ethanol-behandelte Gruppe NaCl als Therapeutikum.

- **Ethanol + NaCl[*12]**
  - Behandlung mit 150 µl NaCl i.p.

[*] Die Herstellerangaben befinden sich unter der fortlaufenden Nummer auf S.40

Zur Validierung des Modells wurde eine dritte Gruppe hinzugefügt, die mit Ethanol und einem TNFα Inhibitor, Infliximab, behandelt wurde. Die Dosierung von 6 mg/kg orientierte sich an der Dosierung im Patienten. UC Patienten werden entweder im Abstand von 8 Wochen intravenös therapiert oder, im Falle eines rezidivierenden Krankheitsverlaufs, bei Beginn eines neuen Schubes. Im Tiermodell wurden die Tiere jeweils am Tag vor der rektalen Ethanolapplikation intraperitoneal mit Infliximab oder NaCl behandelt.

- **Ethanol + TNFα Inhibitor: Infliximab[*10]**

  - Behandlung mit 150 µl einer Verdünnung mit einer Konzentration von 1 mg/ml i.p.
  - Dosierung: 6 mg/kg KG

Um zu testen wie sich die Blockade der Th2-Signalkaskade auf die Kolitis auswirkt wurde eine weitere Gruppe mit einem IL-4/13 Inhibitor, Pitrakinra, behandelt.

- **Ethanol + IL-4/ 13 Inhibitor: Pitrakinra[*9]**

  - Behandlung mit 150 µl einer Lösung mit einer Konzentration von 0,06 mg/ml i.p.
  - Dosierung: 0,4 mg/kg KG

Herstellung des IL-4/13 Inhibitors

Als IL-4/ 13 Inhibitor wurde das spezifische Mutein Pitrakinra verwendet. Es wurde von Prof. Dr. Müller, Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie an der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Bei Pitrakinra handelt es sich um ein 15 kDa schweres, rekombinantes humanes Interleukin 4. Pitrakinra bindet an die IL-4Rα Kette, löst aber wegen zwei Punktmutationen keine Signalweiterleitung aus. Die Bindungsstelle ist jedoch blockiert.

Injektionslösung: 10 µg Pitrakinra[*9]
0,5 % Methylcellulose[*1]
0,05 % TWEEN 80[*1]
PBS[*1]

[*] Die Herstellerangaben befinden sich unter der fortlaufenden Nummer auf S.40

6.6 Behandlungsprotokoll

Die Mäuse wurden nach dem Schema in Abbildung 8 an Tag 1 rekonstituiert und an Tag 8 mit 10 % Ethanol[*1] rektal sensitiviert. Die Medikamente wurden an Tag 7-9 und an den Tagen 14-21 gegeben. Für die Testung von Infliximab erfolgte die Medikamentenapplikation an den Tagen 7, 14 und 17. Rekonstitution, Scoring und Auswertung war in allen Versuchen gleich.

Versuchstag	1	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Rekonstitution	x															
Scoring	x		x		x		x		x	x	x	x	x	x	x	x
Auswertung																x
Rektale Applikation Ethanol 10%			x													
Rektale Applikation Ethanol 50 %										x			x			
Pitrakinra oder NaCl		x	x	x					x	x	x	x	x	x	x	x
Infliximab oder NaCl		x							x			x				

Abbildung 8: Schema zur Auslösung einer Kolitis mit Ethanol.

6.7 Medikamenten- und Ethanolapplikation

Alle Medikamentenapplikationen erfolgten mit einer 1 ml Insulin-BD Mikro-fine 0,33 mm·12,7 mm Spritze [*5] intraperitoneal (i.p).

Für die rektale Sensitivierung an Tag 8 wurde 10 % Ethanol verwendet. Zur Applikation wurde die Maus mit Hilfe einer Isoflurananästhesiebox in Narkose gelegt. Die Sauerstoff-Flussrate betrug 4 l/min bei einer Isoflurankonzentration von 4 %. Nach Erreichen des Toleranzstadiums erfolgte die Applikation mit einem 1 mm Katzen-Katheter[*16]. Zur Betäubung und um die Gleitfähigkeit zu erhöhen wurde der Katheter großzügig mit Xylocain©Gel 2 %[*17] benetzt. Um standardisiert zu applizieren wurde der Katheter zu Beginn auf einer Höhe von 3 cm markiert. Es wurde jeweils 150 µl Ethanol instilliert und durch eine

[*] Die Herstellerangaben befinden sich unter der fortlaufenden Nummer auf S.40

anschließende Hochlagerung der Maus ein Herauslaufen verhindert. Für die Auslösung der Kolitis an den Tagen 15 und 18 wurde 50 % Ethanol[*1] verwendet. Die Applikation erfolgte wie oben beschrieben.

6.8 Tierzahl

Die NOD-Scid IL2Rγ-chain^{null} Mäuse wurden mit den PBMC von 5 verschiedenen Spendern rekonstituiert. Insgesamt wurden 60 Tiere verwendet, von denen 20 als Kontrolle nach der Rekonstitution unbehandelt verblieben. 20 Tiere wurden während der Kolitis mit NaCl behandelt, 8 Tiere mit Infliximab und 12 Tiere mit Pitrakinra.

Tabelle 2: Anzahl der verwendeten Tiere in der jeweiligen Gruppe.
In Klammern ist die Anzahl der verstorbenen bzw. vor Versuchsende getöteten Tiere angegeben.

Spender	NaCl	Infliximab	Pitrakinra	Kontrolle	Summe
Patient 47	4		4 (1)	4	12
Patient 58	4		4	4	12
Patient 59	4		4	4	13
Patient 65	4	4		4	12
Patient 70	4 (2)	4		4	12
Summe	20	8	12	20	60

6.9 Klinischer Aktivitätsscore

Die Mäuse wurden an den in Abbildung 8 aufgeführten Tagen nach den Kriterien in Tabelle 3 beurteilt. Für die statistische Auswertung wurden alle Tagesscores summiert, wobei ein Punkt für „struppiges Fell“ nicht als Einzel-, sondern nur als Zusatzpunkt gezählt wurde. Neben den absoluten Abbruchkriterien (Rektumprolaps, Rektale Blutung, Automutilation und die mit „X“ gekennzeichneten Beobachtungen in Tabelle 3) führte ein Tagesscore > 7 oder ein klinischer Aktivitätsscore > 5 über mehr als 72 Stunden zur sofortigen Euthanasie.

[*] Die Herstellerangaben befinden sich unter der fortlaufenden Nummer auf S.40

Tabelle 3: Kriterien und deren Bewertung zur Beurteilung der klinischen Aktivität der Kolitis in der Maus.
Die Kriterien, die mit „X“ gekennzeichnet sind führten zum sofortigen Versuchsabbruch. Ein klinischer Aktivitätsscore > 7 oder > 5 über mehr als 72 Stunden führte ebenso zur sofortigen Euthanasie.

Kriterium	Beobachtung	Punkte
Körpergewicht	Kein Gewichtsverlust	0
	0-5 % Gewichtsverlust	1
	5-10 % Gewichtsverlust	2
	10-15 % Gewichtsverlust	3
	15-20 % Gewichtsverlust	4
	> 20 %	X
Verhalten	Lebhaft / normal	0
	Ruhig	1
	Struppiges Fell	1
	Apathie oder Selbstisolation	X
Körperhaltung	Normal	0
	Intermittierende Buckelhaltung	1
	Permanente Buckelhaltung	X
Kotkonsistenz	Geformt	0
	Breiig	2
	Flüssig	4
	Flüssig-blutig	X

6.10 Makroskopische Bewertung des Kolons

Nach Ende des Versuches wurden die makroskopischen Veränderungen am Kolon nach den Kriterien in Tabelle 4 bewertet und summiert:

Tabelle 4: Kriterien und deren Bewertung zur Erstellung eines makroskopischen Score.

Kriterium	Ausprägung	Punkte
Kotkonsistenz	Geformt	0
	Ungeformt / breiig	1
	Flüssig	2
Länge	> 10 cm	0
	8 – 10 cm	1
	< 8 cm	2
Dilatation	Keine	0
	Geringgradig	1
	Hochgradig	2
Hyperämie	Vorhanden	2
Nekrose	Vorhanden	2

6.11 Analysen nach Versuchsende

An Tag 21 erfolgte die Tötung der Mäuse. Dafür wurden die Mäuse mit einer Lösung aus Ketamin / Xylazin zunächst anästhesiert. Die Dosierung betrug 2 mg/ Maus Ketamin[*11] und 0,4 mg/ Maus Xylazin[*15]. Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurden die Mäuse retrobulbär entblutet und durch zervikale Dislokation getötet. Es folgte die Entnahme von Milz und Kolon für die weitere Verarbeitung. Die Milz wurde über einem 70 µm Zellsieb[*4] homogenisiert und das Zellsieb mit jeweils 10 ml PBS[*6] gewaschen. Das Milzhomogenisat wurde 5 Minuten bei 1400g zentrifugiert und das Pellet anschließend in PBS[*6] resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für die Durchflusszytometrie gefärbt.

[*] Die Herstellerangaben befinden sich unter der fortlaufenden Nummer auf S.40

Vom Kolon wurde ein ca. 1 cm großes, kotfreies Stück für die Histologie entnommen und in 4% Formaldehyd[*1] fixiert. Ein ebenfalls ca. 1 cm großes, kotfreies Stück wurde mit Hilfe einer Schere in ca. 0,3 cm große Teile geschnitten und in 300 µl RNA-later©[*2] aufbewahrt.

Isolierung von humanen Lamina propria Zellen aus dem Kolon der Maus

Der Rest des Kolons wurde enzymatisch aufgeschlossen um die humanen Leukozyten aus der Lamina propria zu isolieren. Dazu wurde ein Protokoll modifiziert nach Weigmann *et al*. verwendet [145]. Zunächst wurde das Zäkum entfernt und das Kolon längs aufgeschnitten. Kot wurde entfernt und das Kolon in PBS[*6] gewaschen. Mit einer Schere wurde das Kolon sehr klein geschnitten. Für den enzymatischen Verdau wurden folgende Lösungen angesetzt:

Vorverdau-Lösung:	1x HBSS (Ca^{2+}/Mg^{2+}frei)[*7]
	10 mM HEPES[*1]
	2 mM EDTA[*1]
	5% FCS[*2]
	100 U/ml Penicillin-Streptomycin[*3]
Verdau-Lösung:	1x RPMI[*7]
	10 mM HEPES[*1]
	10% FCS[*2]
	100 U/ml Penicillin-Streptomycin[*3]
	+ 125 KU pro Probe Dnase[*3]
	+ 5 mg pro Probe Kollagenase 1A[*3]

Die Proben wurden gruppenweise als Sammelprobe für 2 x 20 Minuten bei 37°C in Vorverdau-Lösung inkubiert. Danach wurden die Proben mit einem 70 µm Zellsieb[*4] filtriert und verbliebenes EDTA[*1] mit 10 ml PBS[*1] abgewaschen. Die Proben wurden in Verdau-Lösung überführt und erneut 2 x 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Proben erneut über einem 70 µm Zellsieb filtriert, das Filtrat in einen 50 ml Falcon[*4] überführt und für 5 Minuten bei 1400g zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS[*6] resuspendiert und die Zellen für die Durchflusszytometrie gefärbt.

[*] Die Herstellerangaben befinden sich unter der fortlaufenden Nummer auf S.40

6.12 FACS-Färbung

Von den Zellsuspensionen wurden jeweils 100 µl Zellsuspension mit 100 µl FACS-Färbelösung für 60 Minuten bei 4°C und unter Lichtabschluss gefärbt. Danach wurden alle Proben mit 400 µl PBS[*6] gewaschen, zentrifugiert (5 Minuten bei 1400g) und anschließend resuspendiert. Färbungen mit Sekundärantikörper wurden nun für weitere 60 Minuten gefärbt und anschließend erneut gewaschen und resuspendiert. Alle Proben wurden an einem BD FACS Canto™ II gemessen und mit der Software FlowJo 10.1 (FlowJo LLC, Oregon, USA) ausgewertet. Alle Antikörper aus Tabelle 5 wurden von Biolegend, London, Großbritannien bezogen.

6.13 FACS-Gatingstrategie

Durch die Parameter FSC und SSC wurde die Leukozytenpopulation bestimmt. Diese konnte durch hCD45 und mCD45 in humane und murine Leukozyten unterteilt werden. Der Rekonstitutionsgrad gibt dabei den Prozentanteil der humanen Zellen in Bezug auf die Gesamtleukozytenpopulation an.

Für die Unterscheidung der T-Zellen wurden Zellen mit CD4, CD8, CD294 (CRTH2), CD44, CD62L gefärbt. Helferzellen wurden als $CD4^+$ und zytotoxische Zellen als $CD8^+$ definiert. In den Untergruppen wurden $CD4^+CD294^+$ als Th2-Zellen definiert. CD44 und CD62L diente zur Aufspaltung in naive $CD62L^+CD44^-$ und Antigen-erfahrene $CD62L^+CD44^+$ Zellen.

Um die myeloiden Zellen näher zu bestimmen wurden die Farbstoffe CD14, CD16, CD1a, CD163, CD206 und CD64 verwendet. Zuerst wurden die Leukozyten in $CD14^+$ und $CD16^+$ Monozyten unterschieden. $CD14^+$ Monozyten wurden dann auf die Expression von CD1a, CD163 und CD206 untersucht. $CD14^+CD163^+CD206^+$ wurden als M2-Makrophagen angesehen.

Zur weiteren Differenzierung der angeborenen Immunität wurden $CD11b^+$ Zellen und $CD11c^+$ Zellen mit CD1a gefärbt. Zuerst wurden die Leukozyten in $CD11b^+$ Makrophagen und $CD11c^+$ dendritische Zellen unterschieden. $CD11b^+$ und $CD11c^+$ wurden dann auf die Expression von CD1a untersucht.

[*] Die Herstellerangaben befinden sich unter der fortlaufenden Nummer auf S.40

Tabelle 5: Antikörper zur FACS-Analyse
Alle Antikörper beziehen sich, soweit nicht durch ein vorangestelltes „m“ angegeben auf das humane Antigen. Eine Übersicht mit den verwendeten Farben, Klonen und der entsprechenden Isotyp-Kontrolle befindet sich in Tabelle 14 im Anhang. Legende: T=T-Zellen, B=B-Zellen, NK= natürliche Killerzellen, Ma=Makrophagen, Gr=Granulozyt, Mo= Monozyt, DC= Dendritische Zelle.

Marker	Funktion	Expression
CD45	Antigenvermittelte B- und T-Zell Aktivierung	Leukozyten
mCD45	Antigenvermittelte B- und T-Zell Aktivierung	Leukozyten
CD62L	Marker für naive B- und T-Zellen	T, B, NK, Ma, Gr
CD44	Ausbildung von Antigen-erfahrenen B- und T-Zellen	T, B, NK, Ma, Gr
CD8	Antigenerkennung und T-Zell Aktivierung	T, NK
CD294	Chemotaxis von nGr, eoGr und Th2 Zellen	T, Gr
CD4	T-Zellen Aktivierung	T, Ma, Gr
CCR4	Bindung von CCL17, CCL22, Chemotaxis	T, B, Gr, Mo, NK
CD14	Angeborene Immunität gegen bakterielles LPS	Mo, Ma, Gr
CD1a	Lipidantigenpräsentation	Ma, Mo, DC
CD163	Vermittlung der Efferozytose über einen Hämoglobin/Haptoglobin Komplex	Ma
CD64	Vermittlung von Phagozytose von IgG/Antigen-Komplexen	Mo, Ma, DC, Gr
CD206	Vermittlung von Phagozytose, Makrophagenaktivierung	Ma, DC
CD11b	Zelladhäsion und Chemotaxis	T, B, NK, Ma, Gr

6.14 Histologie

Die entnommenen Proben aus dem Kolon der Maus wurden sofort in 4 % Formaldehyd-Lösung[*1] gelegt und dort für 24 Stunden aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Proben in 70% Ethanol-Lösung überführt und im Laufe von 7 Tagen in einem Tissue-Tek® Histomat automatisch verarbeitet. Dabei wurde zuerst das Wasser in einer aufsteigenden Alkoholreihe entzogen und anschließend der Alkohol durch Xylol[*1] ersetzt und die Proben in flüssigem Paraffin[*14] getränkt. Das Einbetten der Proben erfolgte am nächsten Tag mittels eines Tissue-Tek®TEC™-Gerätes. Die Paraffin-Blöcke wurden dann mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms mit einer Schnittdicke von 3 µm geschnitten und auf Menzelgläser-Superfrost-Ultra®[*2] aufgezogen.

6.15 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die HE-Färbung wurden die Schnitte zunächst für 2 x 10 Minuten in Xylol[*1] entparaffinisiert und anschließend jeweils 2 x 5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (abs. Ethanol, 96 %, 70 %)[*1] rehydriert. Nach dem Spülen in Aqua bidest.[*1] wurden die Schnitte 4 Minuten in Hämalaun-Lösung[*1] gefärbt und anschließend 10 Minuten unter laufendem Leitungswasser gebläut. Nach erneutem Spülen in Aqua bidest.[*1] erfolgte die Gegenfärbung des Zytoplasmas in Eosin[*1] für 4 Minuten. Anschließend erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe indem die Schnitte jeweils kurz in 80 %, 96 % und abs. Ethanol[*1] gespült wurden. Dann wurden die Schnitte 2 x 5 Minuten in Xylol[*1] fixiert und anschließend mit Malinol[*1] überschichtet und einem Deckglas bedeckt.

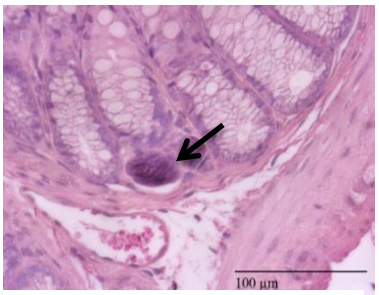
[*] Die Herstellerangaben befinden sich unter der fortlaufenden Nummer auf S.40

6.16 Histologischer Score

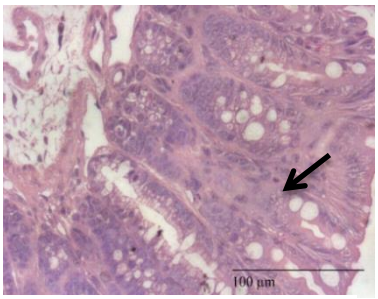
Der histologische Score wurde zusammen mit einem Veterinärpathologen nach den Kriterien in Tabelle 6 beurteilt. Eine Erläuterung zu den einzelnen Kriterien ist in Abbildung 9 dargestellt. Pro Maus wurden vier Schnitte ausgewertet, die von mindestens zwei verschiedenen Stellen stammten.

Tabelle 6: Kriterien und deren Bewertung zur Erstellung eines histologischen Score.

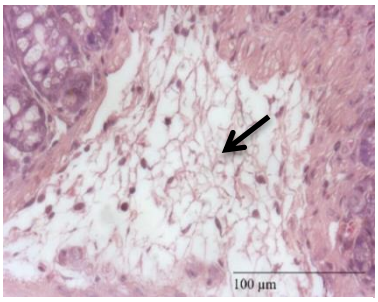
Kriterium	Ausprägung	Punkte
Erosionen Epithel	Fokal	1
	Generalisiert	2
	Basalmembran betroffen / Ulkus	3
Entzündungszellinfiltrat	Geringgradig	1
	Mittelgradig	2
	Hochgradig	3
	Infiltration der Lamina Muskularis	4
Atrophie / Fibrose	Fokal	1
	Generalisiert	2
Ödem	Vorhanden	1
Einblutungen in die Mukosa	Vorhanden	1
Hyperämie	Generalisiert	1
Kryptenabszess	Vorhanden	1



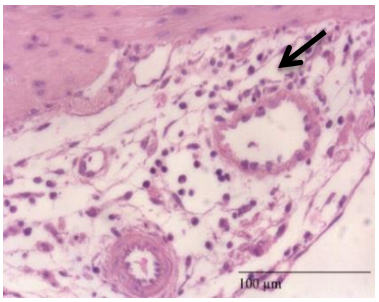
Kryptenabszess an der Kryptenbasis



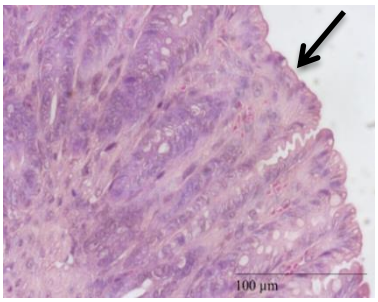
Kryptenatrophie und Bildung eines fibrösen Ersatzgewebes



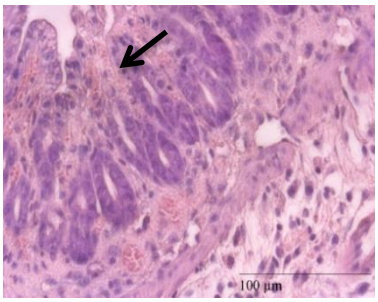
Ödem der Submukosa



Lymphozytäre Infiltration in das Mesenterium



Epithelverlust



Epithelverlust und Hyperämie

Abbildung 9: Detailaufnahmen zum histologischen Score. In den Aufnahmen sind die histologischen Befunde aus Tabelle 6 beispielhaft dargestellt. Die Pfeile zeigen auf die Befunde, die im Untertitel genannt sind. Aufnahmen in 40x Vergrößerung.

6.17 Isolierung von humanen Lamina propria Zellen

Für die Isolierung von humanen Lamina propria Zellen konnten Vollwand-Kolonproben gemäß dem Ethikvotum 22-2015 der LMU gewonnen werden. Die Proben stammten von Kolektomien, die am Klinikum der LMU München, Standort Großhadern, durchgeführt wurden. Es wurde ein modifiziertes Protokoll nach Uronen-Hansson *et al.* zum enzymatischen Aufschluss des Gewebes verwendet [146]. Für die Isolierung wurden folgende Lösungen angesetzt:

Vorverdau-Lösung: 1x HBSS (Ca^{2+}/Mg^{2+}frei)[*7]
10 mM HEPES[*1]
2 mM EDTA[*1]
5 % FCS[*2]
100 U/ml Penicillin-Streptomycin[*3]

Verdau-Lösung: 1 x RPMI[*7]
10 mM HEPES[*1]
10 % FCS[*2]
100 U/ml Penicillin-Streptomycin[*3]
+ 10 KU/ml Dnase[*3]
+ 1 mg/ml Kollagenase 1A[*3]

Die Proben wurden direkt nach der Exzision des Kolons in 1x RPMI[*7] + 10 % FCS[*7] überführt und frisch weiterverarbeitet. Zuerst wurde die Lamina propria mit einer spitzen Schere von unterliegendem Fett- und Bindegewebe getrennt und das Gewebe in ca. 5 mm große Stücke geschnitten. Diese Stücke wurden mit 15 ml Vorverdau-Lösung in einen 50 ml Falcon[*4] gegeben und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung von Hand geschüttelt bis Schaum auftrat, das Gewebe über einem Nylon-Sieb abfiltriert und anschließend weitere 3 x wie oben beschrieben inkubiert. Nach insgesamt 60 Minuten wurde das Gewebe in ein Becherglas überführt und dort mit 1 x RPMI[*7] gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe in einer Petrischale sehr klein geschnitten und mit 20 ml Verdau-Lösung für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Filtration durch einen 70 µm Zellsieb[*4] wurde das Filtrat bei 1400g für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und für die FACS-Analyse gefärbt. In die statistische Auswertung gingen 2 Proben aus makroskopisch veränderten Bereichen von Patienten mit gesicherter UC Diagnose ein und 7 Proben aus makroskopisch unveränderten Bereichen von Patienten, deren Kolon auf Grund einer malignen Entartung des Kolons reseziert wurde.

[*] Die Herstellerangaben befinden sich unter der fortlaufenden Nummer auf S.40

6.18 Isolierung PBMC zur FACS-Analyse

Die Isolierung der PBMC für die FACS-Analyse erfolgte analog der Beschreibung in „Isolierung der PBMC für die Rekonstitution der Mäuse“, Kapitel 6.3, Seite 26. Für die Färbung wurde die Zelldichte auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ bis $5 \cdot 10^6$ pro Färbung eingestellt. Die Färbung der Zellen selbst erfolgte analog der Beschreibung „FACS-Färbung“, Kapitel 6.12, S. 34. In die statistische Auswertung gingen 31 gesunde Spender und 42 UC Patienten ein.

6.19 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der freien Statistik-Software R (www.rproject.org). Für die statistische Analyse mehrerer Gruppen wurde die Varianzanalyse (ANOVA) verwendet und anschließend ein Tukey-HSD Test als multipler Vergleichstest durchgeführt. Der Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit einem T-Test durchgeführt. Bei allen Tests wurde ein Konfidenzintervall von 95% angenommen. Korrelationsanalysen wurden durch eine Spearman Rangkorrelation durchgeführt. Für die Errechnung der *Cut-off* Werte wurde eine Grenzwertoptimierungskurve (*receiver operating characteristic*, ROC) erstellt. Als *Cut-off* Wert wurde der Wert mit dem höchsten Youden Index (Sensitivität + Spezifität – 1) herangezogen.

Das Signifikanzniveau wurde wie folgt definiert:

* $p = 0{,}05 - 0{,}01$

** $p = 0{,}01 - 0{,}001$

*** $p < 0{,}001$

6.20 Herstellerangaben

[1] Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland

[2] Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland

[3] Sigma-Aldrich Co.,St. Louise USA

[4] BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

[5] BD Medical, Le Pont de Claix Cedex, FRA

[6] Life Technologies Corporation, Paisley, UK

[7] Hyclone Laboratories, Inc, Logan, USA

[8] MIBE GmbH, Brehna, Deutschland

[9] Prof. Dr. Müller, Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie an der Universität Würzburg

[10] Remicade©, Janssen Biologics B.V., Leiden, Niederlande

[11] Pfizer, Karlsruhe, Deutschland

[12] B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

[13] R&D Systems, Minneapolis, USA

[14]Sakura Finetec Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande

[15]Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

[16]Henry Schein, Hamburg

[17]AstraZeneca, Wedel

[18] NC Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

7 ERGEBNISSE

7.1 Auswertung der Spender

Aus dem Blut der Spender, mit dem später Mäuse rekonstituiert wurden, wurde vor Versuchsbeginn ebenfalls ein immunologisches Profil erstellt. Für die Erfassung der Krankheitsaktivität der Patienten wurde der Simple Clinical Colitis Activity Index Score (SCAAIS), nach Walmsley erfasst. Er betrug im Mittel 7,6 Punkte auf einer Skala von 1-17 [147]. Alle Patienten waren chronisch erkrankt mit einer mittleren Erkrankungsdauer von 23,4 Jahren (siehe Tab.7).

Tabelle 7: Übersicht über die Krankheitsaktivität der Spender mit UC.

	SCAAIS	Krankheitsdauer	Form	Medikation
Spender 47	5	22 Jahre	Chron.-kontinuierlich	Infliximab, Mesalazin
Spender 58	10	21 Jahre	Chron.-kontinuierlich	Keine
Spender 59	7	21 Jahre	Chron.-kontinuierlich	Keine
Spender 65	5	30 Jahre	Chron.-kontinuierlich	Kolektomie Mesalazine
Spender 70	11	23 Jahre	Chron.-kontinuierlich	Infliximab, Mesalazin

Von den gemessenen $CD8^+$-Zellen in den PBMC von Spender 70 war ein überdurchschnittlich hoher Anteil aktiviert (siehe Abb.10). Der Anteil an aktivierten $CD8^+$ Zellen war bei Spender 59 besonders gering. Der Anteil $CD1a^+$ Zellen an den $CD14^+$ Zellen der Spender entsprach im Allgemeinen dem Anteil dieser Zellpopulationen in der gesamten UC Population. Der Anteil an $CD1a^+$ an den $CD14^+$ Zellen im Blut von Spender 59 lag unter dem Mittelwert der restlichen UC Patienten. Der Anteil an $CD1a^+$ Zellen an den $CD11b^+$ Zellen unterlag dagegen größeren Schwankungen. Die Spender 58, 59 und 65 fielen durch niedrigere Werte auf, während die Spender 47 und 70 hohe Werte aufwiesen.

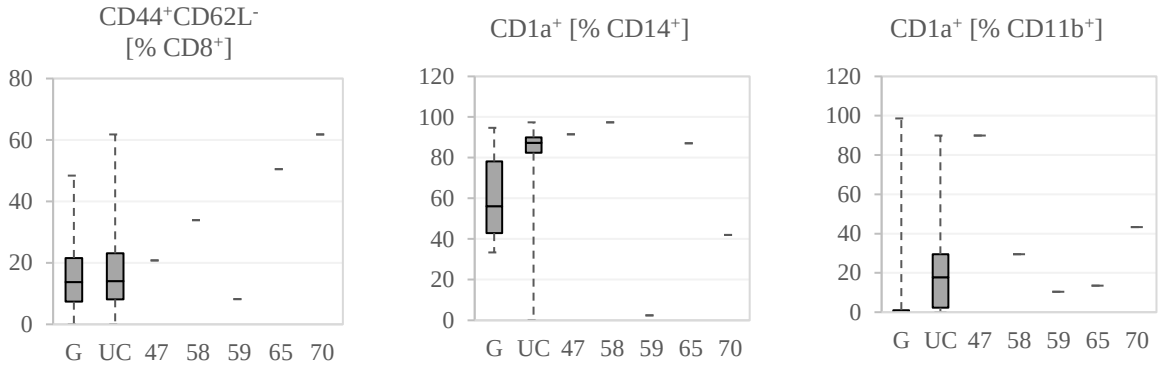


Abbildung 10: Box and Whisker Plot zum Vergleich der Spender mit der gesamten UC Population. Dargestellt ist die gesunde Vergleichspopulation (G) sowie die kranke UC Population (UC). Daneben sind vergleichend die Werte der Spender aufgeführt, die zur Rekonstitution der Versuchstiere verwendet wurden. Mittelwerte, Standardabweichung, p und n für die Gruppen G und UC können Tabelle 9 im Anhang entnommen werden.

7.2 Etablierung einer Modell-Kolitis durch rektales Ethanol

7.2.1 Die Wirkung von Ethanol auf die klinische Aktivität

Um die klinischen Auswirkungen des Behandlungsprotokolls mit Ethanol zu erfassen, wurde ein klinischer Aktivitätsscore erhoben. Jedes Tier wurde an insgesamt 12 Tagen auf 4 verschiedene Kriterien untersucht. Für die statistische Auswertung wurden die Tagessummen für jedes Tier addiert.

Die Behandlung der Tiere nach dem Behandlungsprotokoll in Abbildung 8, zur Auslösung einer Kolitis mit Ethanol, führte zu einer klinischen Symptomatik. Die Tiere zeigten ein ruhiges Verhalten, struppiges Fell, intermittierende Buckelhaltung und eine breiig bis dünnflüssige Kotkonsistenz. Keines der Tiere entwickelte blutigen Durchfall oder einen Rektalprolaps. Im Verlauf des Versuchs erlitten 9,61 % der Ethanol-behandelten Mäuse, den von der Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS als kritisch eingestuften, Gewichtsverlust von mehr als 15 %. Von den Ethanol-behandelten Tieren erlitten 29,61 % der Tiere einen Gewichtsverlust von mehr als 10 %. In den Ethanol + NaCl behandelten Gruppe verstarben 10 % der Tiere. In der unbehandelten Kontrollgruppe verstarb kein Tier.

Der klinische Aktivitätsscore stieg signifikant auf 7,85 ± 8,59 in der Ethanol + NaCl Gruppe an, während er in der Kontrollgruppe auf einem Wert von 1 ± 1,12 verblieb (siehe Abb.11). In der histologischen Auswertung konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg des Scores gemessen werden. Der Basalwert von 1,15 ± 1,01 in der Kontrollgruppe stieg auf 5,8 ± 2,26 in der Ethanol + NaCl Gruppe an. Auch in der makroskopischen Bewertung des Kolons wurden signifikante Unterschiede sichtbar. Während der makroskopische Score in der Kontrollgruppe im Mittel 1,17 ± 1,84 war, betrug er in der Ethanol + NaCl Gruppe 3,52 ± 2,34

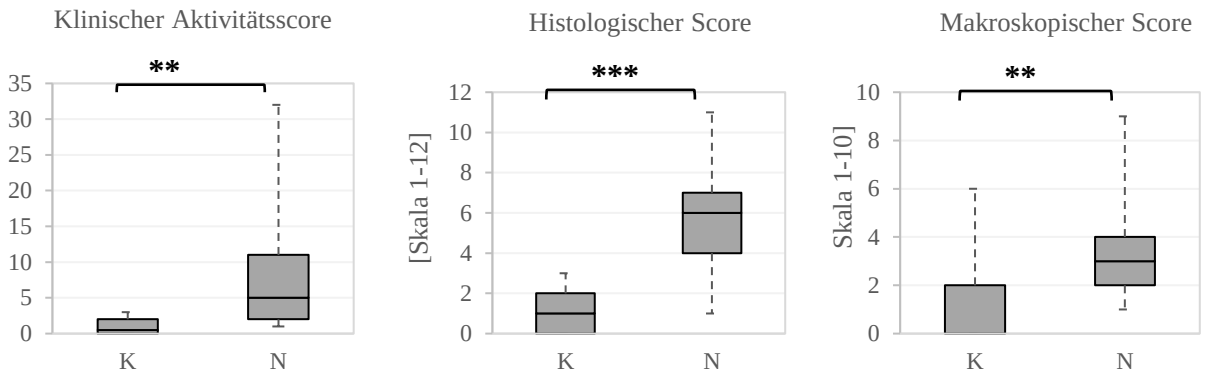


Abbildung 11: Box and Whisker Plot zur Darstellung des klinischen Aktivitätsscore (links), des histologischen Scores (Mitte) und des makroskopischen Scores (rechts) nach Auslösung einer Kolitis. Legende: K= unbehandelte Kontrollgruppe. N= Ethanol + NaCl Gruppe. Mittelwert, Standardabweichung, n, p sind in Tabelle 11 im Anhang ersichtlich.

Das Körpergewicht der Tiere stieg von Tag 1 bis Tag 15 an. In der Ethanol + NaCl Gruppe kam es ab Tag 16 zu einem Abfall des Körpergewichts. Es stieg gegen Ende des Versuches wieder leicht an. An Tag 10, zwei Tage nach der Sensitivierung, war ein geringer Anstieg im klinischen Aktivitätsscore sichtbar. Ein starker Anstieg des klinischen Aktivitässcore zeigte sich am Tag nach der ersten rektalen Ethanolapplikation (Tag 16). Der klinische Aktivitätsscore fiel an Tag 17 wieder ab, um nach der zweiten rektalen Applikation an Tag 18 erneut anzusteigen (siehe Abb.12). Der klinische Aktivitätsscore war zwischen den einzelnen Versuchen sehr variabel und abhängig von den Spendern, mit denen die Mäuse rekonstituiert wurden. Er war in den Versuchen mit Spendern 58 und 59 im Mittel niedriger als in den Versuchen mit den Spendern 47, 65 und 70.

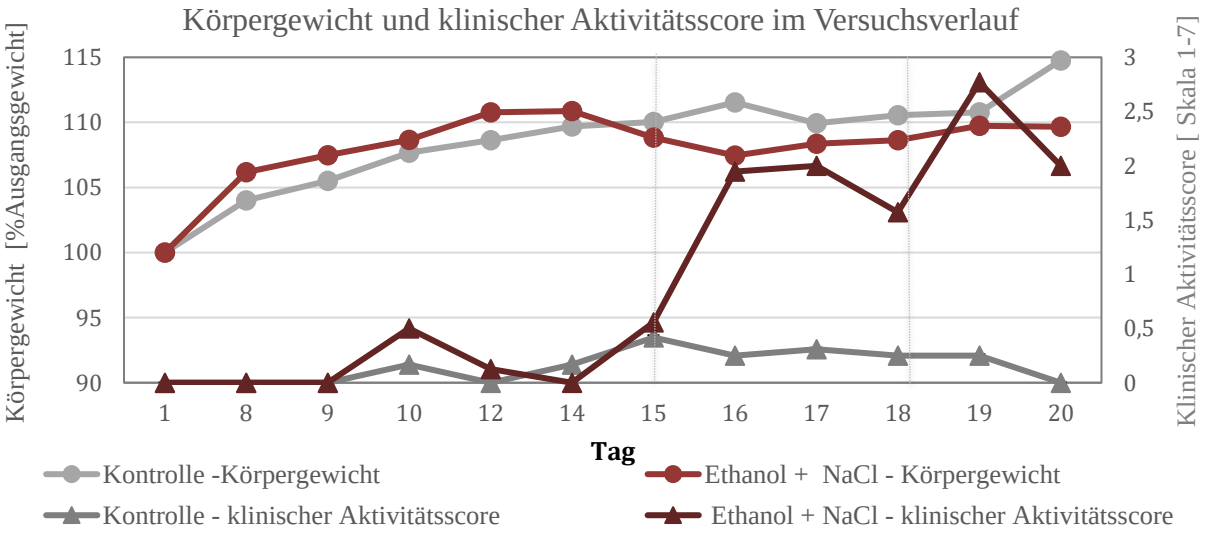


Abbildung 12: Darstellung des klinischen Aktivitätsscore und des Körpergewichts im Versuchsverlauf. Für jeden Tag an dem ein Scoring durchgeführt wurde, wurde der Mittelwert der Tiere einer Gruppe berechnet. Die gestrichelte Linie markiert die Tage, an denen 50% Ethanol appliziert wurde. N= 20 Tiere in jeder Gruppe

An Tag 21 wurden die Tiere getötet und das Kolon makroskopisch bewertet. Der makroskopische Score setzte sich aus 5 Kriterien mit einer Maximalpunktzahl von 10 Punkten zusammen.

In der makroskopischen Bewertung des Darmes war der Enddarminhalt die auffälligste Veränderung (siehe Abb.13). Tiere, die mit Ethanol + NaCl behandelt wurden, hatten keinen geformten Kot im Enddarm. Das Kolon war entweder leer oder mit ungeformtem bis flüssigem Inhalt gefüllt. Die Wand war verdickt und das Kolon dilatiert. Eine starke Verkürzung des Kolons war nur bei Tieren mit hochgradiger klinischer Symptomatik festzustellen.

Kontrolle Ethanol + NaCl

Abbildung 13: Vergleich des makroskopischen Bildes in Kontrollgruppe (links) und der Ethanol + NaCl Gruppe (rechts). Maßstab: schwarzer Balken = 10 cm.

7.2.2 Die Wirkung von Ethanol auf das histologische Bild des Kolons

Das histologische Bild des Kolons der Ethanol-behandelten Tiere zeigte Epithelerosionen und einen Verlust der regelrechten Kryptenarchitektur (siehe Abb.14). Es kam zur Ausbildung eines fibrösen Ersatzgewebes zwischen den einzelnen Krypten. Der Verlust des Epithels ging häufig mit Einblutungen in die Lamina propria einher. Die Submukosa war ödematisiert und von Entzündungszellen infiltriert. Manche Tiere zeigten zudem Kryptenabszessen.

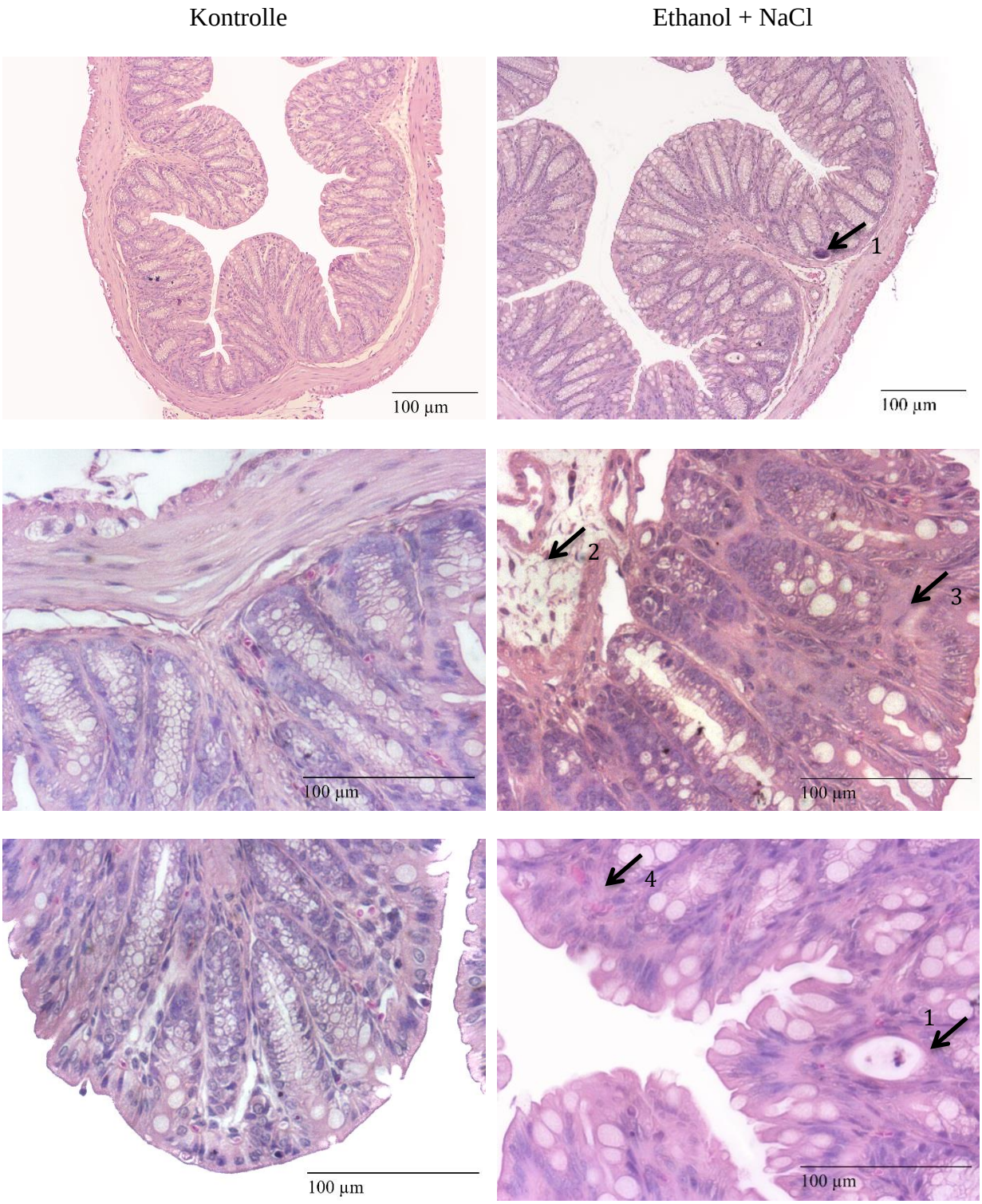


Abbildung 14: Vergleich des histologischen Bildes in Kontrollgruppe (links) und der Ethanol + NaCl Gruppe (rechts). Übersichtsaufnahmen in 10 x Vergrößerung, Detailaufnahmen in 40 x Vergrößerung. Die Tiere zeigten nach Kolitisauslösung Kryptenabszessen (1), Ödeme der Submukosa (2), Fibrose (3) und Hyperämie (4).

7.2.3 Unterscheidung zwischen gesund und krank im Tiermodell

Um zu überprüfen wie zuverlässig eine Kolitis durch das Behandlungsprotokoll (siehe Abb.8) ausgelöst werden konnte, musste ein *Cut-off* Wert berechnet werden, mit dem gesunde von kranken Tieren unterschieden werden können. Für den klinischen Aktivitätsscore betrug die *area under the curve (AUC)* 0,89. Bei einem klinischen Aktivitätsscore > 2,5 werden 70 % der kranken Tiere als richtig krank (Sensitivität) und 90 % der gesunden Tiere als richtig gesund erkannt (Spezifität). Für den histologischen Score betrug die *area under the curve (AUC)* 0,97. Bei einem histologischen Score > 3,5 werden 90 % der kranken Tiere als richtig krank (Sensitivität) und 100 % der gesunden Tiere als richtig gesund (Spezifität) erkannt (siehe Abb.15).

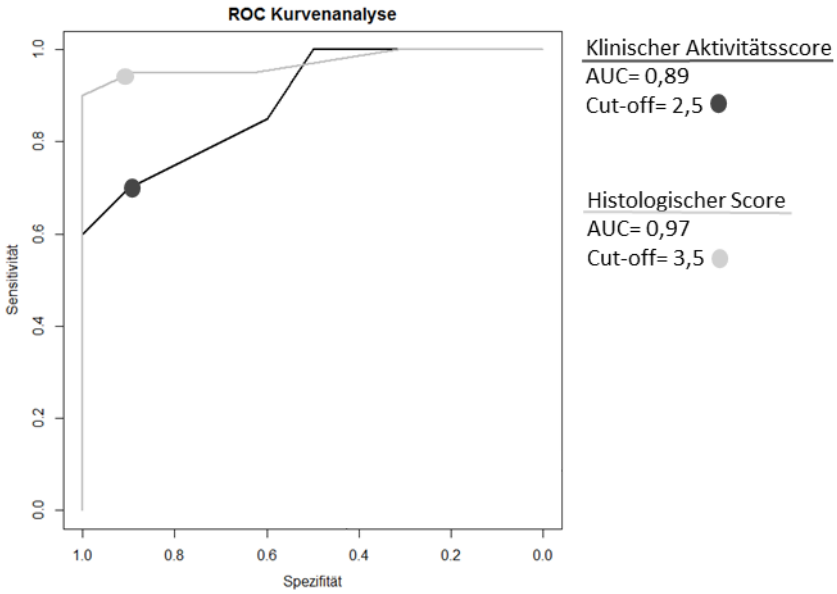


Abbildung 15: ROC Kurvenanalyse zur Bestimmung der Cut-off Werte für die Unterscheidung zwischen kranken und gesunden Tieren im Tiermodell.

Von den Ethanol-behandelten Tieren hatten 30 % (6 von 20 Tieren) der Tiere einen klinischen Aktivitätsscore < 2,5 und 10 % (2 von 20 Tieren) der Tiere einen histologischen Score < 3,5. Die Tiere, deren histologischer Score < 3,5 war, hatten auch einen klinischen Aktivitätsscore < 2,5. Diese Tiere waren trotz Ethanol-Behandlung als gesund einzustufen. In der Kontrollgruppe hatten 5 % (1 von 20 Tieren) der Tiere einen klinischen Aktivitätsscore > 2,5 und kein Tier einen histologischen Score > 3,5.

7.3 Charakterisierung der immunologischen Vorgänge in der Maus und im Patienten

7.3.1 Die Wirkung von Ethanol auf die immunologischen Vorgänge

Für die Charakterisierung der immunlogischen Vorgänge wurde die Milz der Tiere aufbereitet und für die FACS-Analyse gefärbt. Der Fokus lag auf den Monozyten-, Makrophagen- und T-Zellpopulationen. Parallel zu den Tierstudien wurde das Blut von gesunden Spendern und von UC Patienten mittels FACS-Analyse untersucht und ein immunologisches Profil erstellt. Der direkte Vergleich zum Profil des Menschen stellt ein wichtiges Kriterium dar, um die Übertragbarkeit des Tiermodells auf den Menschen zu evaluieren.

Das Verhalten von CD45$^+$ Zellen im Tiermodell

Um den Gesamtanteil der humanen Zellen zu überprüfen wurde hCD45 als Panleukozytenmarker für humane Zellen und mCD45 als Panleukozytenmarker für murine Zellen eingesetzt. Der Anteil der CD45$^+$ Zellen an der Gesamtleukozytenpopulation betrug 8,74 ± 9,38 % in den Kontrollgruppen und 15,04 ± 12,76 % in der Ethanol + NaCl Gruppe (siehe Abb.16). Ethanol-behandelte Tiere hatten im Mittel mehr humane Zellen als unbehandelte Kontrolltiere.

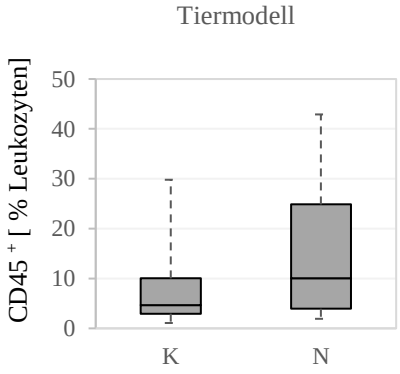


Abbildung 16: Box and Whisker Plot zur Darstellung des Anteils CD45$^+$ Zellen in der Milz der Maus. Legende: K= unbehandelte Kontrollgruppe. N= Ethanol + NaCl Gruppe. Mittelwert, Standardabweichung, n, p sind in Tabelle 11 im Anhang ersichtlich.

Das Verhalten von CD4$^+$ Zellen im Tiermodell und im UC Patienten

Da UC als Th2-vermittelte Erkrankung beschrieben ist, wurde das Verhalten der CD4$^+$ Zellen untersucht. Um die CD4$^+$ Zellen genauer zu charakterisieren wurde die CD4$^+$ Zellpopulation mit den Oberflächenmarkern CD44 und CD62L weiter unterteilt (siehe Abb.17).

Zusätzlich wurden CD4$^+$ Zellen mit dem Marker CD294 gefärbt um den Anteil der Th2-Zellen zu bestimmen.

Der Anteil an $CD4^+$ Zellen in der Gesamtleukozytenpopulation betrug in der unbehandelten Gruppe 2,66 ± 5,57 % und stieg durch die Ethanol-Behandlung auf 5,57 ± 7,83 % an. $CD4^+CD44^+CD62L^+$ Zellen wurden als $CD4^+$ Antigen-erfahrene Zellen betrachtet. Es war ein signifikanter Anstieg dieser Zellen von 2,64 ± 2,14 % auf 6,82 ± 7,19 % in der Ethanol + NaCl Gruppe zu beobachten. In der Patientenpopulation verliefen sowohl die Konzentration der $CD4^+$ Zellen als auch die Konzentration der $CD4^+CD44^+CD62L^+$ Zellen gegenläufig zum Tiermodell. $CD4^+$ fiel von 32,72 ± 12,62 % in der gesunden Population auf 23,89 ± 12,30 % in der UC Population. Die $CD4^+CD44^+CD62L^+$ Zellen fielen von 57,44 ± 19,57 % auf 29,22 ± 21,95 %. Es war kein Effekt auf die $CD4^+CD294^+$ Zellen nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

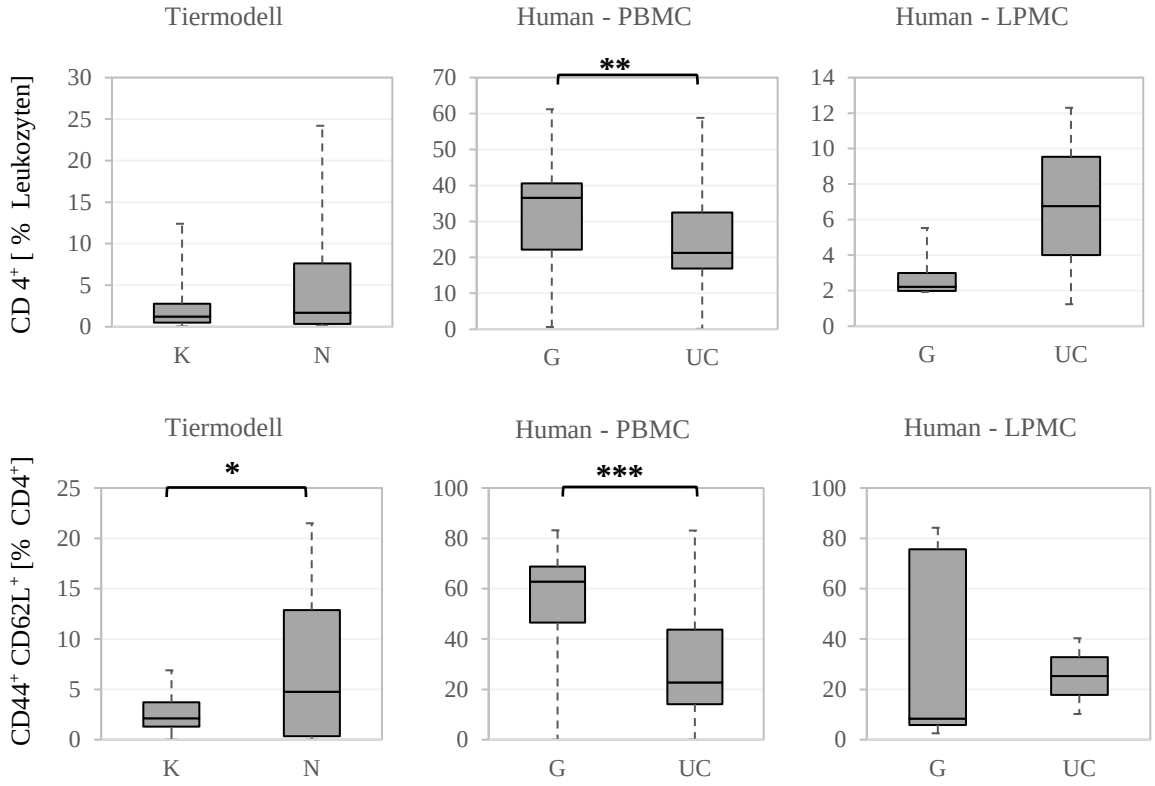


Abbildung 17: Box and Whisker Plot zu Darstellung des Anteils $CD4^+$ Zellen und der $CD4^+CD44^+CD62L^+$ Zellen in der Milz der Maus(links). Vergleichend ist der Anteil dieser Zellen in humanen PBMC (Mitte) und LMPC (rechts) dargestellt. Legende: K= unbehandelte Kontrollgruppe. N= Ethanol + NaCl Gruppe. G= Gesund. UC= UC Patient. Mittelwert, Standardabweichung, n, p sind in Tabelle 9-11 im Anhang ersichtlich.

Das Verhalten von CD8⁺ Zellen im Tiermodell und im UC Patienten

Der Anteil an $CD8^+$ Zellen an den Gesamtleukozyten betrug in der Kontrollgruppe im Median 1,08 ± 1,95 % während er in der Ethanol + NaCl Gruppe 1,70 ± 4,12 % betrug. In den PBMC von UC Patienten machten $CD8^+$ Zellen einen Anteil von 16,54 ± 7,7 % aus und dieser Anteil ist im Vergleich zu gesunden Spendern fast unverändert. Anders ist die Situation im Kolon. In den LPMC von gesunden Spendern fanden sich 4,19 ± 2,79 % $CD8^+$ Zellen während dieser Anteil im Kolon von UC Patienten auf 7,63 ± 9,42 % anstieg. Der Anteil an $CD8^+CD44^+CD62L^+$ Zellen an den $CD8^+$ Zellen fällt durch die Auslösung einer Kolitis in der Maus von 6,25 ± 8,2 auf 4,02 ± 9,03 %. In den PBMC der UC Patienten fiel der Anteil dieser Zellen ebenfalls von 36,60 ± 20,06 % auf 19,20 ± 15,46 %. Im Gegensatz dazu stieg er in den isolierten Lamina propria Zellen von 22,38 ± 17,40 % auf 47,25 ± 0,07 %.

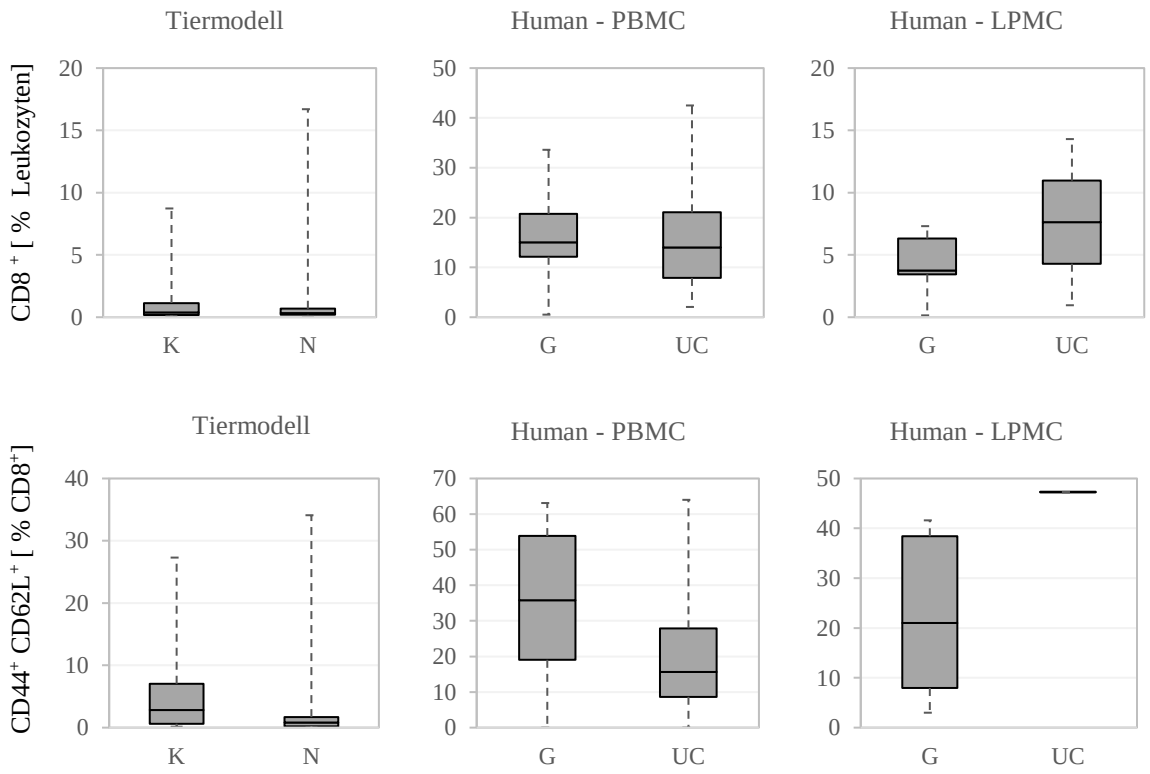


Abbildung 18: Box and Whisker Plot zu Darstellung des Anteils $CD8^+$ Zellen und der $CD8^+CD44^+CD62L^+$ Zellen in der Milz der Maus (links). Vergleichend ist der Anteil dieser Zellen in humanen PBMC (Mitte) und LMPC (rechts) dargestellt. Legende: K= unbehandelte Kontrollgruppe. N= Ethanol + NaCl Gruppe. G= Gesund. UC= UC Patient. Mittelwert, Standardabweichung, n, p sind in Tabelle 9-11 im Anhang ersichtlich.

Das Verhalten von CD14⁺ Zellen im Tiermodell und im UC Patienten

Der Anteil an $CD14^+$ Zellen an der Gesamtleukozytenpopulation steigt durch die Ethanol-Behandlung von 3,03 ± 4,38 % in der Kontrollgruppe auf 6,48 ± 7,24 % in der Ethanol + NaCl Gruppe (siehe Abb. 19). Während der Anteil an $CD14^+$ Zellen im Blut der UC Patienten ähnlich hoch ist wie in gesunden Spendern, steigt er in den LPMC der UC Patienten signifikant von 1,50 ± 0,64 % auf 5,29 ± 0,42 % an.

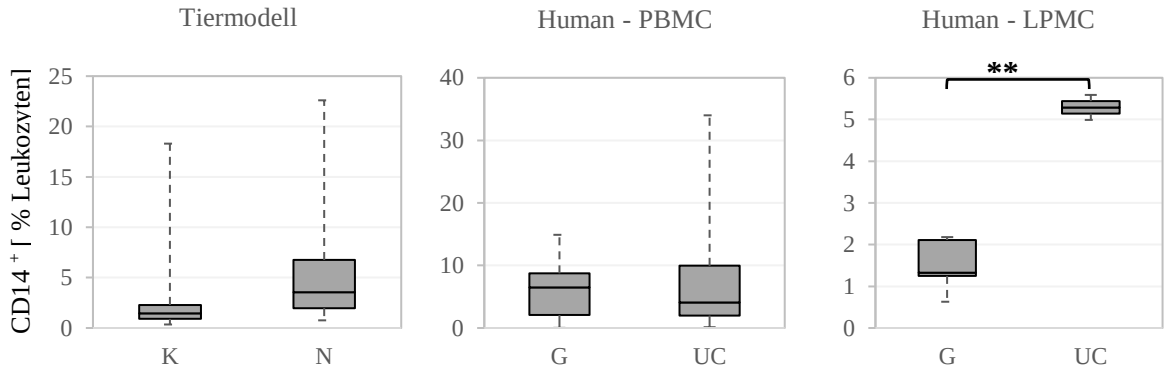


Abbildung 19: Box and Whisker Plot zur Darstellung des Anteils $CD14^+$ Zellen in der Milz der Maus (links). Vergleichend ist der Anteil dieser Zellen in humanen PBMC (Mitte) und LMPC (rechts) dargestellt). Legende: K= unbehandelte Kontrollgruppe. N= Ethanol + NaCl Gruppe. G= Gesund. UC= UC Patient. Mittelwert, Standardabweichung, n, p sind in Tabelle 9-11 im Anhang ersichtlich.

Das Verhalten von $CD64^+CD14^+$ Zellen im Tiermodell und im UC Patienten

Der Anteil an $CD64^+CD14^+$ Zellen an den $CD14^+$ Zellen steigt durch die Ethanol-Behandlung in der Ethanol + NaCl Gruppe signifikant von 3,48 ± 3,47 % auf 16,91 ± 12,71 % an (siehe Abb.20). Im Blut der Patienten ist nur eine kleine Population an $CD14^+CD64^+$ aufzufinden, die niedriger ist als bei gesunden Spendern. In den LPMC der UC Patienten ist der Anteil an $CD14^+CD64^+$ mit 26,85 ± 4,17 % signifikant höher als in der gesunden Vergleichspopulation mit 12,63 ± 5,98 %.

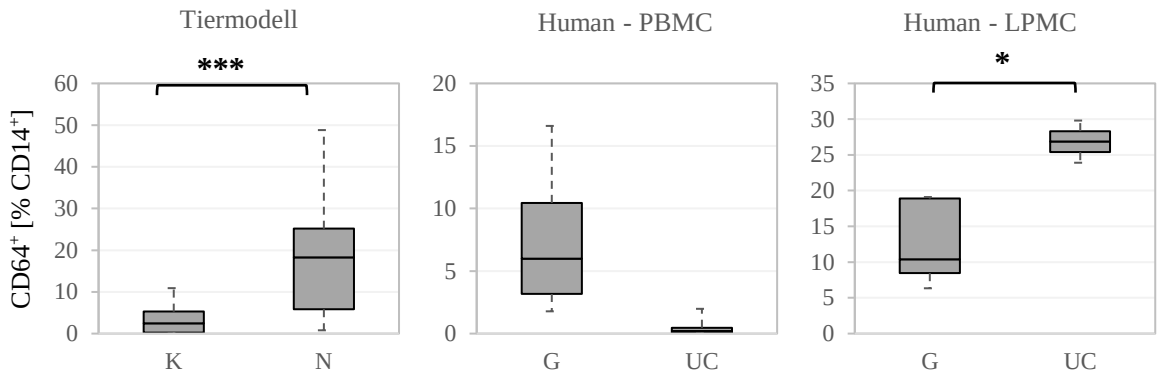


Abbildung 20: Box and Whisker Plot zur Darstellung des Anteils CD64$^+$CD14$^+$ Zellen in der Milz der Maus (links). Vergleichend ist der Anteil dieser Zellen in humanen PBMC (Mitte) und LMPC (rechts) dargestellt. Legende: K= unbehandelte Kontrollgruppe. N= Ethanol + NaCl Gruppe. G= Gesund. UC= UC Patient .Mittelwert, Standardabweichung, n, p sind in Tabelle 9-11 im Anhang ersichtlich.

Das Verhalten von CD163$^+$CD14$^+$ Zellen im Tiermodell und im UC Patienten

Der Anteil der CD163$^+$CD14$^+$ Zellen an den CD14$^+$ Zellen steigt in der Ethanol + NaCl Gruppe signifikant von 7,66 ± 6,77 % auf 25,16 ± 19,70 % an (siehe Abb.21). Dieser Anstieg lässt sich in den isolierten Lamina propria Zellen der UC Patienten nachvollziehen. Dort steigt der Anteil dieser Zellen von 13,66 ± 3,26% auf 21,7 ± 5,37 % an. In den PBMC der UC Patienten ist kein Effekt zu sehen.

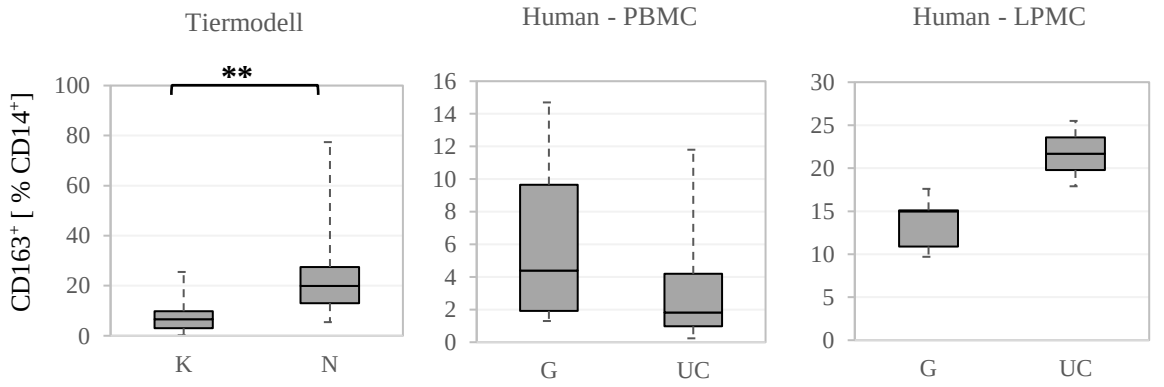


Abbildung 21: Box and Whisker Plot zur Darstellung des Anteils CD163$^+$CD14$^+$ Zellen in der Milz der Maus (links). Vergleichend ist der Anteil dieser Zellen in humanen PBMC (Mitte) und LMPC (rechts) dargestellt. Legende: K= unbehandelte Kontrollgruppe. N= Ethanol + NaCl Gruppe. G= Gesund. UC= UC Patient. Mittelwert, Standardabweichung, n, p sind in Tabelle 9-11 im Anhang ersichtlich.

Das Verhalten von CD1a$^+$CD14$^+$ Zellen im Tiermodell und im UC Patienten

Der Anteil an CD1a$^+$CD14$^+$ Zellen an den CD14$^+$ Zellen steigt von 7,33 ± 5,27 % in der Kontrollgruppe auf 24,28 ± 23,37 % in der Ethanol + NaCl Gruppe (siehe Abb.22). UC Patienten haben im Mittel 79,78 ± 24,10 % dieser Zellpopulation im Blut während dieser Wert in gesunden Vergleichsproben nur bei 59,3 ± 22,41 % liegt. Im Kolon der UC Patienten steigt der Anteil dieser Zellen von 48,94 ± 16,96 %auf 72,55 ± 1,76%

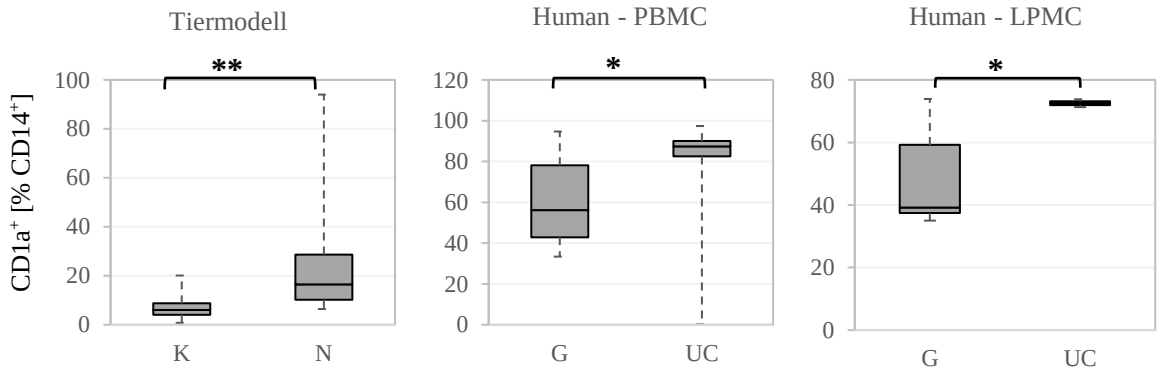


Abbildung 22: Box and Whisker Plot zur Darstellung des Anteils CD1a$^+$CD14$^+$ Zellen in der Milz der Maus (links). Vergleichend ist der Anteil dieser Zellen in humanen PBMC (Mitte) und LMPC (rechts) dargestellt. Legende: K= unbehandelte Kontrollgruppe. N= Ethanol + NaCl Gruppe. G= Gesund. UC= UC Patient. Mittelwert, Standardabweichung, n, p sind in Tabelle 9-11 im Anhang ersichtlich.

Das Verhalten von CD1a$^+$CD11b$^+$ Zellen im Tiermodell und im UC Patienten

Die Behandlung mit Ethanol erhöht den Anteil der CD1a$^+$CD11b$^+$ Zellen an den CD11b$^+$ Zellen im Tiermodell von 6,28 ± 3,31 % auf 12,62 ± 6,40 % (siehe Abb.23). Im menschlichen Blut steigen CD1a$^+$CD11b$^+$ Zellen von 5,077 ± 17,97 % auf 23,06 ± 23,02 %. In den analysierten LPMC ist ein Anstieg von 18,37 ± 7,24 % auf 51,95 ± 14,21% sichtbar.

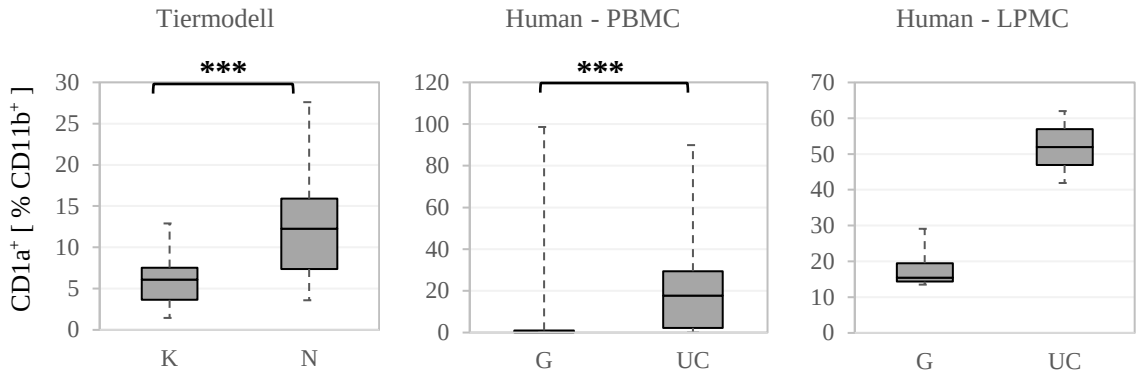


Abbildung 23: Box and Whisker Plot zur Darstellung des Anteils $CD1a^+CD11b^+$ Zellen in der Milz der Maus (links). Vergleichend ist der Anteil dieser Zellen in humanen PBMC (Mitte) und LMPC (rechts) dargestellt. Legende: K= unbehandelte Kontrollgruppe. N= Ethanol + NaCl Gruppe. G= Gesund. UC= UC Patient. Mittelwert, Standardabweichung, n, p sind in Tabelle 9-11 im Anhang ersichtlich.

7.3.2 Charakterisierung der immunologischen Vorgänge im Kolon der Maus

Um die Entzündung genauer zu charakterisieren wurden die Immunzellen direkt am Ort der Entzündung, im Kolon der Maus, untersucht (siehe Abb.24). Dazu wurden die humanen Zellen, die in die Lamina propria der Maus ausgewandert waren, enzymatisch isoliert. Da die Zahl der isolierten Zellen pro Kolon gering war, wurden die Proben gruppenweise analysiert. Während die $CD4^+$ Zellen in der behandelten Gruppe auf 1,36% abfielen, stiegen die $CD8^+$ Zellen von 0,24 % auf 0,92 % an. $CD14^+$ Zellen fielen durch die Kolitis von 9,36 % auf 8,16 % während $CD11b^+$ Zellen von 6,24 % auf 7,9 % stiegen.

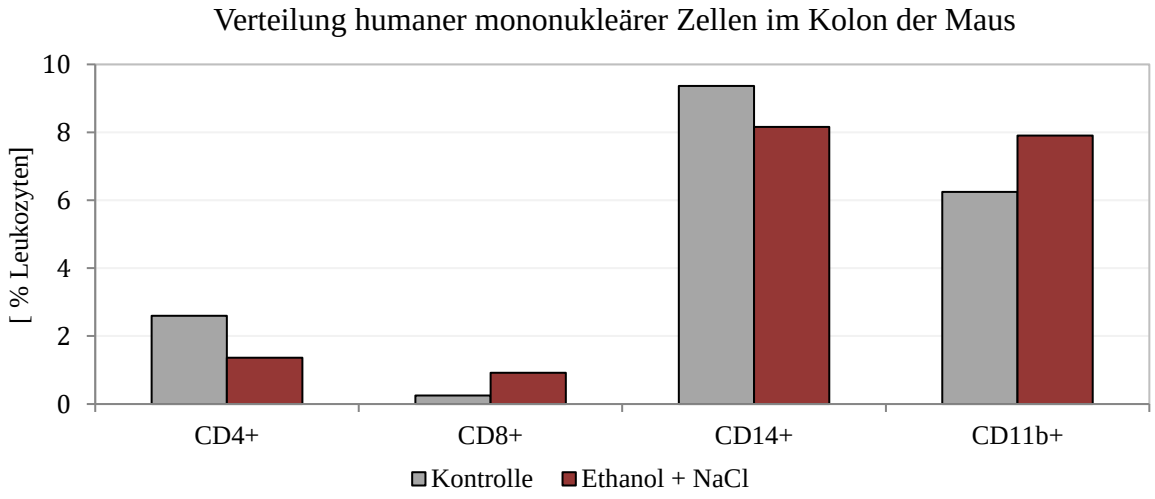


Abbildung 24: Verteilung humaner mononukleärer Zellen im Kolon der Maus.
Die Proben wurden gruppenweise analysiert (n=4 Tiere in jeder Gruppe). Aufgetragen ist der Mittelwert aller Gruppenproben aus 5 Versuchen.

7.4 Effekte durch einen TNFα Inhibitor

7.4.1 Die Wirkung von Infliximab auf die klinische Aktivität

Die klinische Aktivität wurde, wie oben beschrieben, in den drei Kategorien klinischer Aktivitätsscore, histologischer Score und makroskopischer Score beurteilt. Das Auslösen der Kolitis führte zu einer signifikanten Erhöhung des klinischen Aktivitätsscore. Die Ethanol-Behandlung löste in der Ethanol + Infliximab Gruppe eine ähnliche Symptomatik aus wie in der Ethanol + NaCl Gruppe. Die Symptome waren aber weniger ausgeprägt und hielten kürzer an. Der Abfall des Körpergewichts war in der Ethanol + Infliximab Gruppe nicht zu beobachten. Auch der Anstieg des klinischen Aktivitätsscore war in der Ethanol + Infliximab Gruppe geringer als in der Ethanol + NaCl Gruppe.

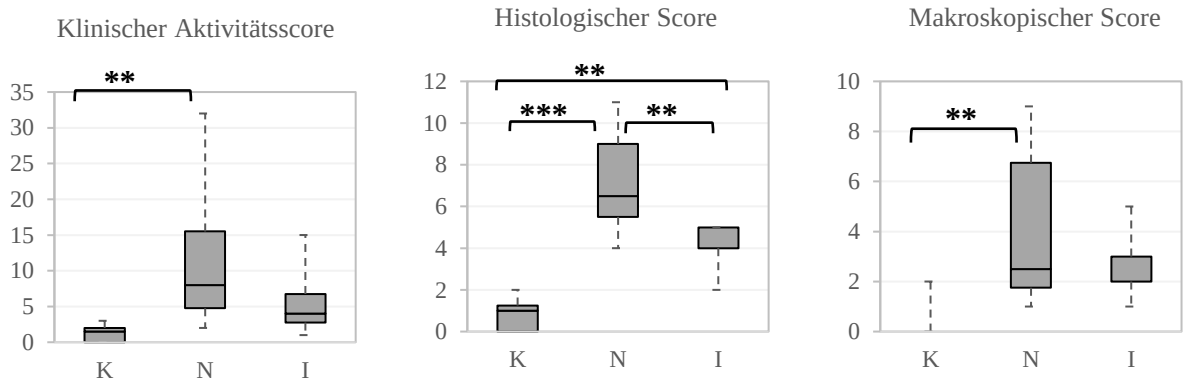


Abbildung 25: Box and Whisker Plot zur Entwicklung des klinischen Aktivitätsscores (links), des histologischen Scores (Mitte) und des makroskopischen Scores (rechts) nach Gabe von Infliximab. Legende: K= unbehandelte Kontrollgruppe. N= Ethanol + NaCl Gruppe. I= Ethanol + Infliximab Gruppe. Mittelwert, Standardabweichung, n, p in Tabelle 12 im Anhang ersichtlich.

Das Kolon der Mäuse wurde makroskopisch inspiziert und ein Score erhoben. In der Ethanol + NaCl Gruppe zeigte sich ein hyperämisches Kolon, das ungeformten Kot enthält. Auch im Kolon der Infliximab-behandelten Tiere war nur wenig, aber besser geformter Kot erkennbar. Das Kolon war außerdem weniger dilatiert und hatte seltener hyperämische Bereiche als in der Ethanol + NaCl Gruppe.

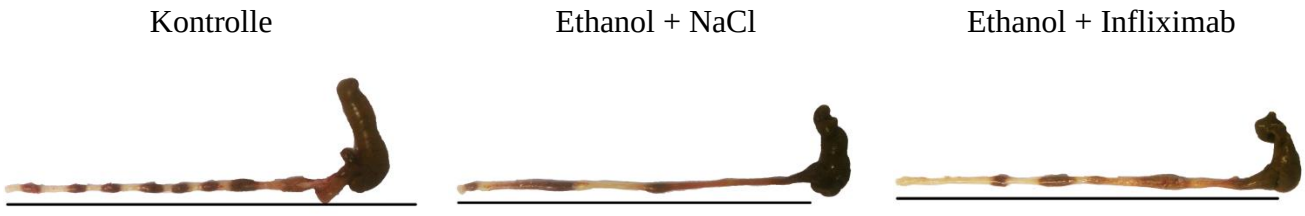


Abbildung 26: Vergleich des makroskopischen Bildes in Kontrollgruppe (links), Ethanol + NaCl Gruppe (Mitte) und Ethanol + Infliximab Gruppe (rechts). Maßstab: schwarzer Balken = 10 cm.

7.4.2 Die Wirkung von Infliximab auf das histologische Bild des Kolons

Der histologische Score der Tiere in der Ethanol + Infliximab Gruppe war signifikant niedriger als in der Ethanol + NaCl Gruppe. Der histologische Score ging aber nicht auf den Ausgangswert in der Kontrollgruppe zurück. Mäuse, die mit Infliximab behandelt wurden, zeigten häufiger fibrotische Veränderungen als die Tiere in den anderen Therapiegruppen.

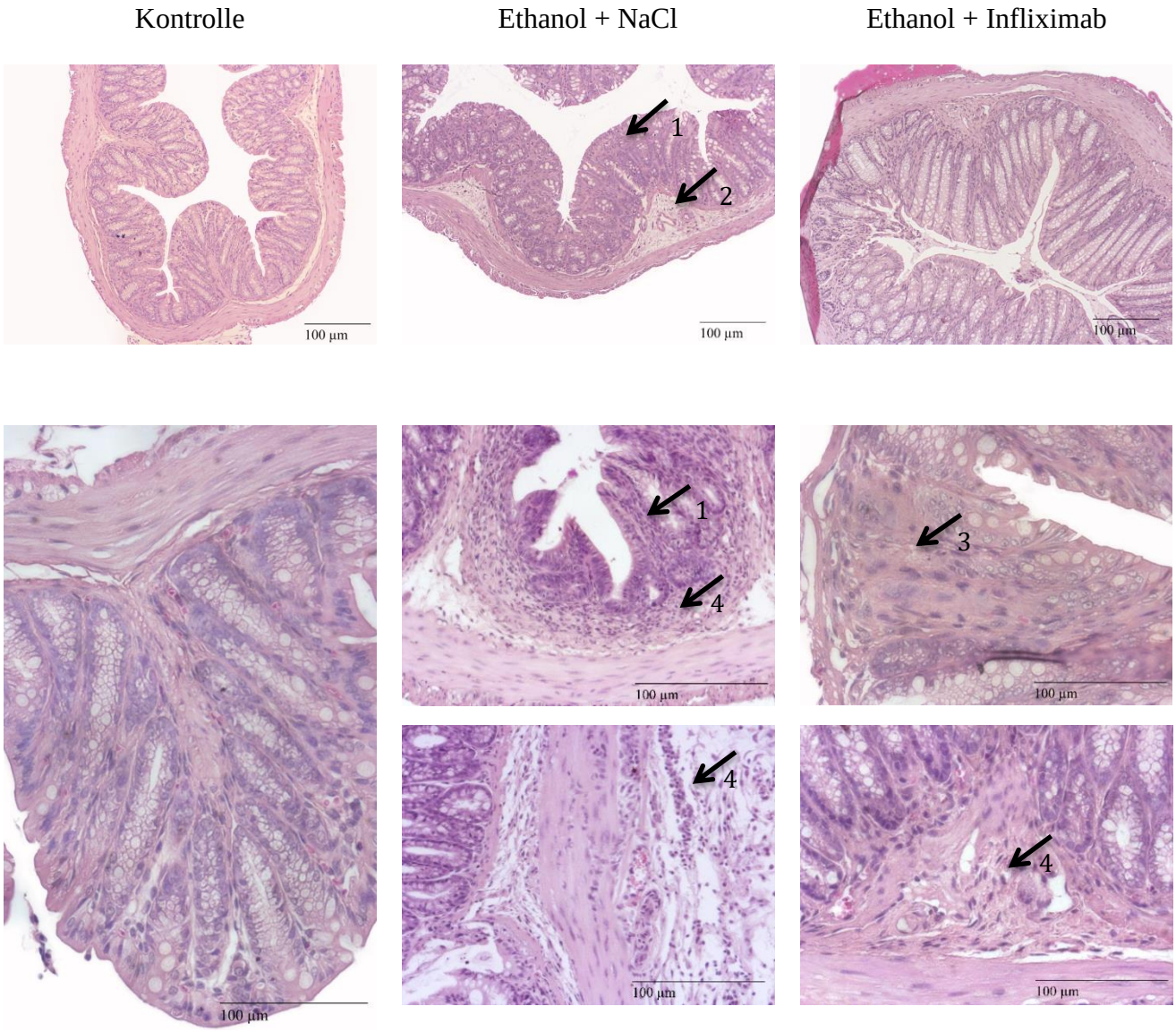


Abbildung 27: Vergleich des histologischen Bildes in Kontrollgruppe (links), Ethanol + NaCl Gruppe (Mitte) und Ethanol + Infliximab Gruppe (rechts). Übersichtsaufnahmen in 10x Vergrößerung, Detailaufnahmen in 40x Vergrößerung. Die Tiere zeigen nach der Ethanol-Behandlung Epithelerosion und Kryptenverlust (1), Ödeme der Submukosa (2), Fibrose (3) und zelluläre Infiltration des Mesenteriums und der Submukosa (4).

7.4.3 Die Wirkung von Infliximab auf das immunologische Profil

Die Wirkung von Infliximab auf T-Zellen

Der Anstieg der $CD4^+CD44^+CD62L^+$ Zellen war, wie in den vorhergehenden Versuchen, signifikant. Durch die Gabe von Infliximab fiel der Anteil der $CD4^+CD44^+CD62L^+$ Zellen an den $CD4^+$ Zellen auf 1,71 ± 2,97 % während er in der Ethanol + NaCl Gruppe auf 15,47 ± 4,38 % stieg. Der Anstieg der $CD4^+$ Zellen war nicht signifikant. Durch Infliximab stieg außerdem der Anteil an naiven $CD8^+CD44^-CD62L^+$ Zellen an. Dieser Effekt war allerdings nicht signifikant.

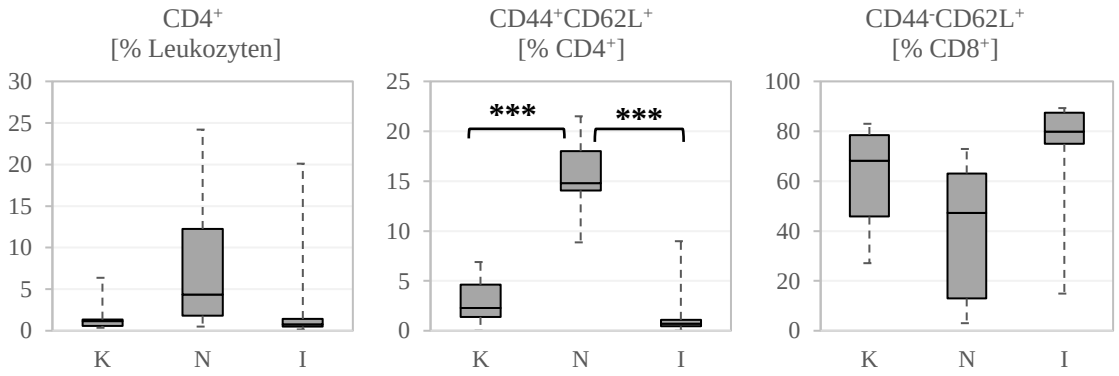


Abbildung 28: Box and Whisker Plot zur Entwicklung der $CD4^+$ Zellen (links), $CD4^+CD44^+CD62L^+$ (Mitte) und $CD8^+CD44^-CD62L^+$ (rechts) in der Milz der Maus. Legende: K= unbehandelte Kontrollgruppe. N= Ethanol + NaCl Gruppe. I= Ethanol + Infliximab Gruppe. Mittelwert, Standardabweichung, n, p sind in Tabelle 12 im Anhang ersichtlich.

Die Wirkung von Infliximab auf $CD14^+$ und Subpopulationen

Alle Monozytenpopulationen, die in der Ethanol + NaCl Gruppe signifikant erhöht waren, konnten durch Infliximab wieder in Richtung Ausgangssituation (Kontrollgruppe) gesenkt werden (siehe Abb.29). Der Anteil an $CD64^+CD14^+$ Zellen an den $CD14^+$ Zellen fällt von 23,51 ± 5,32 % in der Ethanol + NaCl Gruppe auf 16,35 ± 3,38 % in der Ethanol + Infliximab Gruppe. Der Anteil an $CD1a^+CD14^+$ Zellen an den $CD14^+$ Zellen fällt von 39,33 ± 31,25 % in der Ethanol + NaCl Gruppe auf 16,35 ± 3,38 % in der Ethanol + Infliximab Gruppe.

Der Anteil an $CD163^+CD14^+$ Zellen an den $CD14^+$ Zellen fiel von 27,78 ± 23,06 % in der Ethanol + NaCl Gruppe auf 9,69 ± 7,34 % in der Ethanol + Infliximab Gruppe. Der Anteil an $CCR4^+CD14^+$ Zellen an den $CD14^+$ Zellen fällt von 11,01 ± 8,17 % in der Ethanol + NaCl Gruppe auf 6,8 ± 6,85 % in der Ethanol + Infliximab Gruppe.

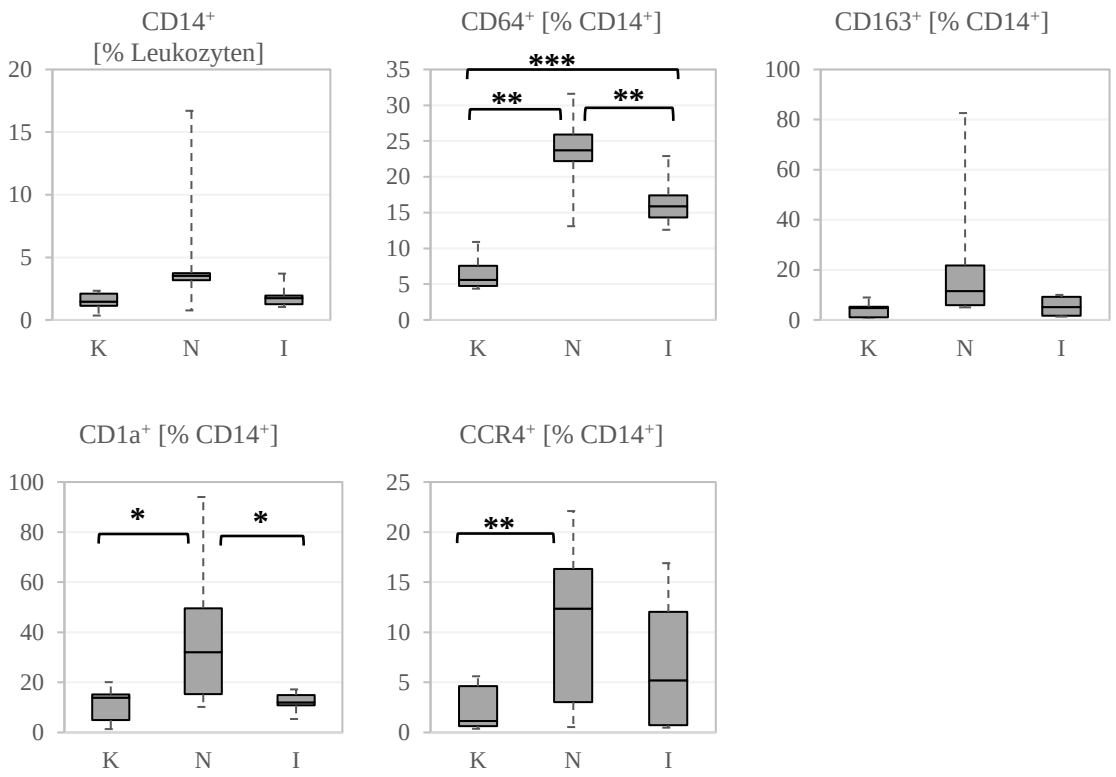


Abbildung 29: Box and Whisker Plot zur Entwicklung der CD14+ Zellen und der anteiligen Subpopulationen in der Milz der Maus nach Kolitisauslösung. Legende: K= unbehandelte Kontrollgruppe. N= Ethanol + NaCl Gruppe. I= Ethanol + Infliximab Gruppe. Mittelwert, Standardabweichung, n, p sind in Tabelle 12 im Anhang ersichtlich.

7.5 Effekte durch einen IL-4/13 Inhibitor

7.5.1 Die Wirkung von Pitrakinra auf die klinische Aktivität

Im Tiermodell führte Pitrakinra nicht zu einer Verbesserung der klinischen Aktivität. Von insgesamt 12 behandelten Tieren zeigten 41,6 % (5 Tiere) einen Gewichtsverlust > 15 % und 1 Tier verstarb. Wie in der Ethanol + NaCl Gruppe zeigten sich die klinischen Symptome in einem ruhiges Verhalten, struppigem Fell, intermittierende Buckelhaltung und einer breiig bis dünnflüssigen Kotkonsistenz.

Das makroskopische Bild war ebenfalls durch eine akute Entzündungssymptomatik gekennzeichnet. Das Kolon war dilatiert und von hyperämischen Bereichen gekennzeichnet. In einzelnen Fällen waren Nekrosen sichtbar (siehe Abb.30).

Abbildung 30: Vergleich des makroskopischen Bildes in Kontrollgruppe (links) und Ethanol + Pitrakinra Gruppe (rechts). Maßstab: schwarzer Balken = 10 cm.

7.5.2 Die Wirkung von Pitrakinra auf das histologische Bild des Kolons

Histologisch war das Kolon geprägt von akuten Entzündungssymptomen. Die Tiere zeigten Ödeme in der Submukosa und eine starke Infiltration des angrenzenden Mesenteriums mit lymphozytären Zellen. Im Epithel waren Erosionen, und in einem Fall, Nekrosen sichtbar. Fibrotische Veränderungen waren in der Ethanol + Pitrakinra Gruppe selten.

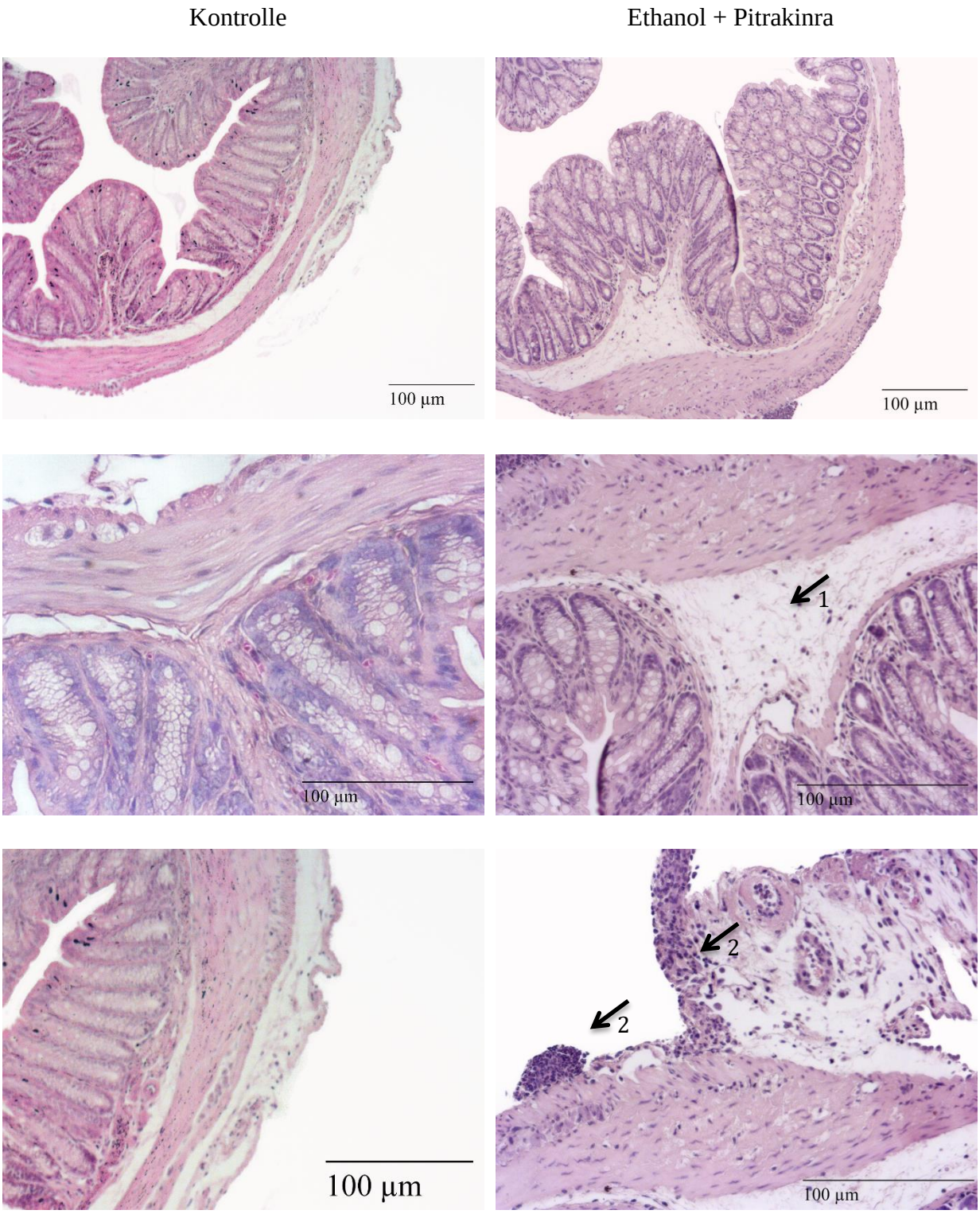


Abbildung 31: Vergleich des histologischen Bildes in Kontrollgruppe (links) und Ethanol + Pitrakinra Gruppe (rechts). Übersichtsaufnahmen und unten links in 10 x Vergrößerung, restliche Detailaufnahmen in 40 x Vergrößerung. Die Tiere zeigen nach Kolitisauslösung unter anderem Ödeme der Submukosa (1) und eine zelluläre Infiltration des Mesenteriums (2).

7.5.3 Die Wirkung von Pitrakinra auf das immunologische Profil

In der Analyse zeigte sich ein erhöhter Anteil der $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ Zellen an der Gesamtleukozytenpopulation in der Milz der Mäuse. Auch der Anteil der $CD4^+CD44^+CD62L^+$ und $CD8^+CD44^+CD62L^+$ Zellen war signifikant erhöht. Die Monozyten und Makrophagensubpopulationen, die durch Infliximab gesenkt werden konnten, stiegen durch die Behandlung mit Pitrakinra signifikant an (siehe Abb.32). Der Anteil der $CCR4^+CD14^+$ Zellen an den $CD14^+$ Zellen stieg von 1,96 ± 0,76 % in der Kontrollgruppe auf 3,51 ± 0,99 % in der Ethanol + Pitrakinra Gruppe an. Der Anteil an $CCR4^+CD11b^+$ Zellen stieg von 5,67 ± 2,8 % auf 13,95 ± 2,58 %. Auch die $CD1a^+CD11b^+$ Zellen stiegen von 10,91 ± 4,8 % in der Ethanol + NaCl Gruppe auf 12,99 ± 2,71 % in der Ethanol + Pitrakinra Gruppe. Die $CD4^+CD44^+CD62L^+$ Zellen stiegen durch die Behandlung mit Pitrakinra von 2,49 ± 3,18% in der Ethanol + NaCl Gruppe auf 10,93 ± 9,56% in der Ethanol + Pitrakinra Gruppe an. Der Anteil der $CD8^+$ Zellen stieg von 1 ± 2,12% auf 4,09 ± 3,59% an. In der $CD8^+CD44^+CD62L^+$ Population war durch Pitrakinra ein Anstieg von 1,22 ± 2,11% auf 13,02 ± 13,06% zu sehen. Wenn man alle T-Zellen, unbeachtet ihrer Differenzierung, mit Hilfe des $CD3^+$ Pan T-Zellmarkers betrachtet bestätigt sich der Anstieg der T-Zellen.

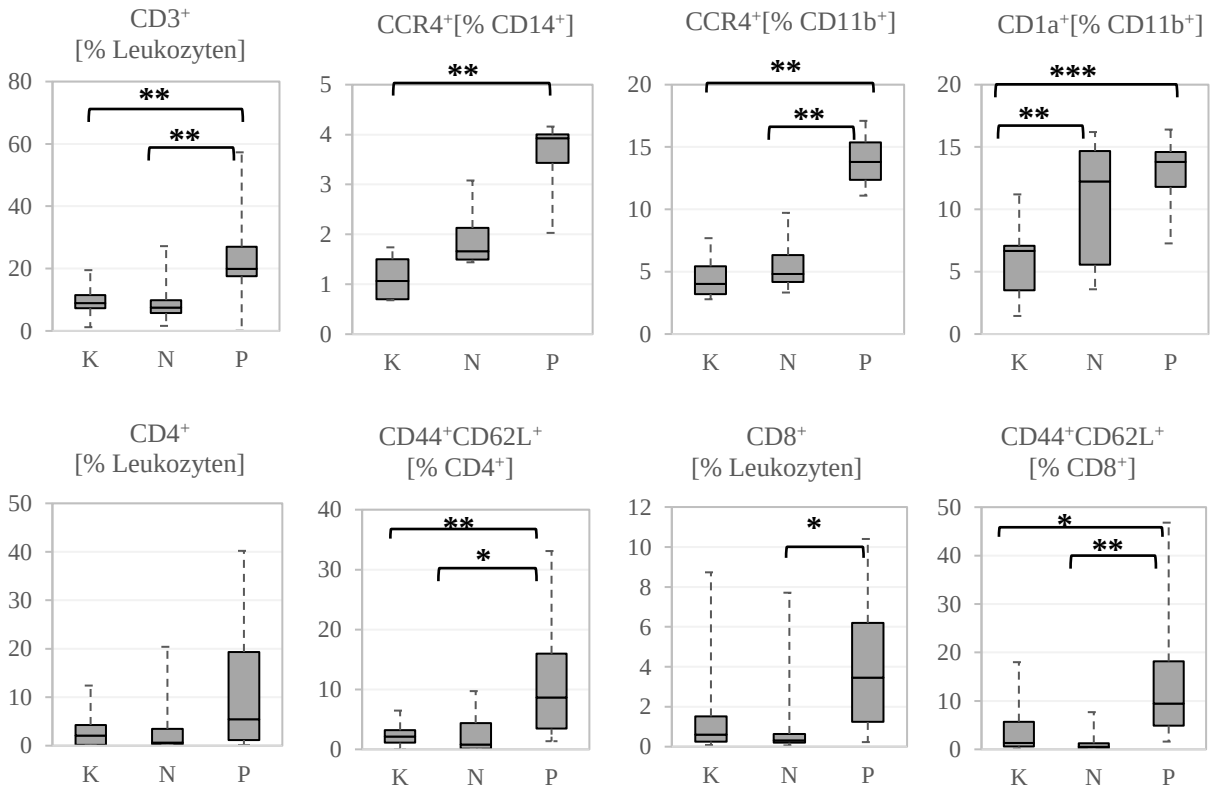


Abbildung 32: Box and Whisker Plots zu Darstellung der Wirkung von Pitrakinra in der Milz der Maus (P). Vergleichend ist der Anteil der jeweiligen Zellen in der unbehandelten Gruppe (K) und der Ethanol + NaCl Gruppe (N) dargestellt. Mittelwert, Standardabweichung, n, p sind in Tabelle 13 im Anhang ersichtlich.

7.6 Herstellung eines Zusammenhangs zwischen den beteiligten Zellen und der klinischer Aktivität der Kolitis

Um zu evaluieren wie die gefundenen Zellpopulationen mit der Entwicklung der klinischen Aktivität zusammenhängen wurde eine Spearman Rangkorrelation erstellt. Dabei waren $CD14^+CD64^+$ positiv und signifikant mit einem höheren klinischen Aktivitätsscore verknüpft (siehe Tab.8). $CD14^+CD64^+$, $CD14^+CD163^+$, $CD11b^+CD1a^+$ Zellen waren positiv und signifikant mit einer Erhöhung des histologischen Score verknüpft.

Tabelle 8: Korrelationsanalyse zwischen den beteiligten Zellen und der Entwicklung des klinischen Aktivitätsscore und des histologischen Score. K=Korrelationskoeffizient. P= Signifikanzwert.

		[%$CD14^+$]	[%$CD14^+$]	[%$CD14^+$]	[%$CD11b^+$]
	$CD14^+$	*$CD64^+$*	*$CD163^+$*	*$CD1a^+$*	*$CD1a^+$*
Klinischer Aktivitätsscore	K=0,213	K=0,518 P= 0,009	K=0,224	K=0,255	K=0,254
Histologischer Score	K=0,340	K=0,787 P <0,0001	K=0,459 P < 0,0001	K=0,326	K=0,544 P= 0,006

8 DISKUSSION

8.1 Profil der Spender

Das Profil der Spender war hochgradig variabel (siehe Abb.10). Dies entspricht insofern den Erwartungen, als dass die Patienten sich in unterschiedlichen Phasen der Erkrankung befanden. Die Spender 58 und 59 wiesen den höchstens SCAAIS Score auf, waren aber ohne Behandlung, während die anderen Patienten trotz medikamentöser Behandlung, oder trotz Zustand nach Kolektomie, noch eine nennenswerte Krankheitsaktivität in Form von blutigen Durchfällen und Abdominalschmerzen zeigten. Ihre Erkrankung ist also möglicherweise als schwerer wiegend einzustufen, da sie trotz Ausnutzung der therapeutischen Möglichkeiten noch unter einer klinischen Symptomatik litten.

8.2 Ziel I Etablierung einer Modell-Kolitis durch rektales Ethanol

8.2.1 Hypothesen 1.1 und 1.2: Klinischer Aktivitätsscore

In Studien, die Oxazalon zur Kolitisauslösung nutzen wurde Ethanol als Kontrolle verwendet und es zeichnete sich ab, dass Ethanol in Wildtypmäuse allenfalls zu einer milden Kolitis führt [138]. In der vorliegenden Studie fiel der klinische Aktivitätsscore höher aus als erwartet. Einen zuerst vermuteten Zusammenhang mit einer niedrigen Rekonstitutionsrate mit humanen Zellen konnte eine Korrelationsanalyse ausschließen (Daten nicht gezeigt). Die klinische Aktivität war zwischen den einzelnen Versuchen variabel und abhängig von den Spendern, mit deren Zellen die Mäuse rekonstitutiert wurden. Sie war in den Versuchen mit den Spendern 58 und 59 am niedrigsten. Spender 59 fiel durch einen niedrigen Anteil an $CD8^+CD44^+CD62L^+$ Zellen, sowie $CD1a^+CD14^+$ und $CD1a^+CD11b^+$ Zellen auf.

Diese spenderspezifische Variabilität lässt die Annahme zu, dass in den gegebenen PBMC eine Form des immunologischen Gedächtnisses enthalten sein muss, das den Schweregrad einer Reaktion auf einen Trigger beeinflusst. Durch die Analysen in dieser Studie konnte keine Zellpopulation eindeutig als Ursache der spenderspezifischen Variabilität ausgemacht werden.

8.2.2 Hypothese 1.3: Histologische Veränderungen

Die histologischen Veränderungen entsprachen den Erwartungen. Die Ausprägung der Kolitis wurde durch einen Veterinärpathologen als gering eingestuft (siehe Abb.11 und Abb.14). Vergleicht man den Schweregrad der histologischen Veränderungen in diesem Modell mit dem Schweregrad der histologischen Veränderungen, wie sie zum Beispiel von Erben *et al*. in einem DSS oder Fichtner-Feigl *et al.* in einem TNBS Modell beschrieben sind, fällt auf, dass

die Veränderungen in diesem Model vergleichsweise gering ausfielen [105, 148]. Der klinische Aktivitätsscore und der Gewichtsverlust der Tiere waren in diesem Model dennoch hoch. Von mehreren Autoren wurde beschrieben, dass der Schweregrad einer chemisch induzierten Kolitis stark vom verwendeten Versuchstierstamm abhängig ist. Während C57Bl/6 Mäuse zum Beispiel in einem DSS Modell kaum Symptome zeigten, reagierten BALB/c Mäuse auf denselben Reiz sehr empfindlich [129].

8.2.3 Hypothese 1.4 Unterscheidung zwischen gesund und krank im Tiermodell

Die Analyse zeigte, dass 30 % der Ethanol-behandelten Tiere, bei Beurteilung des klinischen Aktivitätsscores, nicht als krank einzustufen waren. Betrachtet man den histologischen Score waren es nur 10 % der Tiere. Dies kann zwei Gründe haben. Mäuse sind Beutetiere und als solche versuchen sie Krankheitsanzeichen zu verbergen. Der klinische Aktivitätsscore kann deswegen leicht unterschätzt werden. Der höhere AUC Wert zeigt, dass der histologische Score in diesem Modell besser geeignet ist, um zwischen gesund und krank zu unterscheiden (siehe Abb.15).

Zum anderen beträgt die Sensitivität, mit der kranke Tiere richtig als krank erkannt werden für den klinischen Aktivitätsscore nur 70%. Auch dies könnte dazu beitragen, dass ein Teil der Ethanol-behandelten Tiere als falsch-gesund eingestuft wurde.

Fazit

Die verwendeten NOD-scid IL2Rγ^{null} Mäuse reagieren stammspezifisch empfindlich auf eher geringe histologische Veränderungen. Im histologischen Score zeigten 90 % der Tiere nach der Behandlung mit Ethanol eine Kolitis. Keines der Tiere, das nicht mit Ethanol behandelt wurde, entwickelte, dem histologischen Score nach zu urteilen, eine Kolitis. Mit diesem Versuchsprotokoll konnte also eine stabile Kolitis ohne nennenswerte Letalität ausgelöst werden, die sich durch eine signifikante Erhöhung der klinischen Aktivität äußerte. Die Hypothesen 1.1 - 1.4 und das Ziel I konnten bestätigt werden.

8.3 Ziel II.: Charakterisierung der immunologischen Vorgänge in der Maus

8.3.1 Hypothese 2.1: CD45$^+$

Bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe durch Nolte *et al*. war der Rekonstitutionsgrad in diesem Modell sehr variabel [138]. Während der Effekt damals keiner Behandlungsgruppe zugeordnet werden konnte, ist in dieser Arbeit der Rekonstitutionsgrad signifikant von der Behandlungsart abhängig. Mäuse in der Ethanol + NaCl Gruppe waren besser rekonstituiert als die unbehandelten Kontrolltiere (siehe Abb.16). Das Auslösen einer Kolitis scheint ein Zytokinmilieu zu etablieren, das die klonale Expansion der humanen Zellen fördert.

Der insgesamt niedrige Rekonstitutionsgrad kann möglicherweise mit der Zeitdauer des Versuches erklärt werden. In einer Untersuchung von Hesselton, *et al.* zur Rekonstitution von SCID Mäusen mit PBMC stieg der lösliche Rezeptor für Il-2, der als Maß für die Rekonstitution definiert wurde, erst nach 4-6 Wochen an [149]. Andere Autoren berichten bereits nach einer Versuchsdauer von 40 Tagen von einer *graft versus host disease* [150]. Dementsprechend muss die Dauer des Versuchs und das Behandlungsprotokoll in diesem Tiermodell sehr sorgfältig abgewogen werden. Ein weiterer Faktor könnte die Zellzahl sein. Während von Pearson *et al.* eine Zellzahl von $20 \cdot 10^6$ für die Rekonstitution einer Maus vorschlagen wurde, wurden in diesem Protokoll nur $4 \cdot 10^6$ Zellen injiziert [151]. Die Versuchsdauer von 21 Tagen und die niedrige Zellzahl wurde gewählt um den Einfluss einer *graft versus host disease* auszuschließen, auch wenn diese Versuchsdauer mit einem niedrigeren Rekonstitutionsgrad verknüpft war. Für zukünftige Studien sollte, auch weil die Chronizität der Erkrankung dann besser dargestellt werde kann, ein längerer Versuchsaufbau in Betracht gezogen werden.

8.3.2 Hypothesen 2.1 - 2.3: CD4$^+$

Im Einklang mit einer vorangegangenen Arbeit von Nolte *et al.* hatte die Ethanol-Behandlung keinen Effekt auf die Th2-Zellen (Daten nicht gezeigt). Dies ist ein Hinweis darauf, dass in diesem Modell keine Th2-vermittelte Immunantwort dargestellt wird. Auch die CD4$^+$ und die CD4$^+$CD44$^+$CD62L$^+$ Zellen verhalten sich im Tiermodell anders als im Blut und den Lamina propria Zellen des Menschen (siehe Abb.17).

8.3.3 Hypothesen 2.1 - 2.4: CD8$^+$

Obwohl die absolute Anzahl an nachweisbaren CD8$^+$ Zellen eher gering war zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Ethanol + NaCl Gruppe (siehe Abb.18). Bedenkt man den unter „Hypothese 2.1 - 2.3: CD14$^+$CD1a$^+$ und CD11b$^+$CD1a$^+$“

diskutierten Zusammenhang der Aktivierung von $CD8^+$ Zellen durch $CD1a^+$Zellen und $CD64^+$ Zellen könnte dieser Effekt auch sekundär sein, da Mäuse in der Ethanol + NaCl Gruppe auch vermehrt $CD1a^+$ und $CD64^+$ exprimierten. Da der Anteil $CD8^+$ Zellen auch im Kolon der UC Patienten und im Kolon der Ethanol behandelten Mäuse anstieg (siehe Abb. 24) kann vermutet werden, dass diese Zellpopulation im Zusammenhang mit der Pathogenese der Erkrankung steht. Der Anteil der $CD8^+CD44^+CD62L^+$ Zellen fiel sowohl im Tiermodell durch die Auslösung einer Kolitis, als auch im Blut der UC Patienten. Im Gegensatz dazu waren diese Zellen im Kolon der UC Patienten erhöht. Ein Grund dafür könnte eine Auswanderung in den entzündeten Darm sein. Da belastbare Daten zum Verhalten dieser Zellen im Kolon der Maus fehlen, kann diese Hypothese jedoch nicht bestätigt werden.

8.3.4 Hypothesen 2.1 - 2.3: $CD64^+CD14^+$

Der Anteil an $CD64^+$ Zellen in der Milz war in allen Versuchen signifikant erhöht. Außerdem korrelierte $CD14^+CD64^+$ positiv mit der Höhe des klinischen Aktivitätsscores ($p=0,009$) und mit der Höhe des histologischen Scores ($p<0,0001$) (siehe Abb.20 und Tab.8). Die Funktion dieser Zellen wurde *in vivo* bisher vor allem im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der Sepsis beschrieben, da die Expression von CD64 auf neutrophilen Granulozyten durch deren Aktivierung steigt und als prognostischer Marker verwendet werden kann [152].

Eine Arbeit von Grage-Griebenow *et al.* zeigte, dass $CD64^+CD14^+$ Zellen *in vitro* auf Stimulierung in hohem Maße IFNγ und IL-12 ausschütten .[81]. Das ausgeschüttete IFNγ und IL-12 könnte im Tiermodell zu einer Th1 und M1-Polarisierung führen. Im DSS Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass die Beteiligung des M1-Makrophagen zu einer Verschlechterung der Kolitis führte [153-155]. Dieser Zusammenhang könnte die Erklärung für die erhöhten $CD64^+CD14^+$ und T-Zellpopulationen in Verbindung mit einem hohen histologischen Score in unserem Tiermodell sein.

Interessanterweise ist in der Patientenpopulation CD64 im peripheren Blut erniedrigt, während andere Studien einen erhöhten Anteil $CD64^+$ Zellen im Blut von CED Patienten feststellen [156]. Dies könnte darin begründet sein, dass CD64 in dieser Studie in Kombination mit $CD14^+$ gefärbt wurde. In der Kombination mit $CD14^+$ handelt es sich um eine Monozytenpopulation, die zwar auch im peripheren Blut vorkommt, aber größtenteils im Zielgewebe zu finden ist. Passend zu dieser Hypothese war der Anteil an $CD14^+CD64^+$ Zellen im Kolon der UC Patienten signifikant höher als in den gesunden Vergleichsproben.

8.3.5 Hypothesen 2.1 - 2.3: CD163+CD14+

$CD163^+$ ist ein Marker für die Makrophagendifferenzierung. Während Monozyten nur geringe Mengen an CD163 exprimieren, zeigen Makrophagen ein hohes Expressionslevel an $CD163^+$. CD163 ist plasmalöslich und wird nach der Aktivierung dieser Zellen durch eine

Metalloprotease abgespalten. In anderen Studien war der Anteil an $CD163^+$ Zellen in UC und CD Patienten im peripheren Blut und im entzündeten Kolon erhöht [86, 157, 158].

Der Anteil der $CD163^+$ Zellen war im Blut der Patienten in dieser Studie erniedrigt. Dies könnte dadurch erklärbar sein, dass die Patientengruppe in dieser Studie nicht Therapie-naiv war und beschrieben wurde, dass die Gabe eines TNFα Inhibitors die Konzentration von $CD163^+$ Zellen im Blut senkt [158]. Der erhöhte Anteil dieser Zellen im Kolon der UC Patienten konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (siehe Abb.21).

8.3.6 Hypothese 2.1 - 2.3: $CD14^+CD1a^+$ und $CD11b^+CD1a^+$

$CD1a^+$ Zellen wurden im Zusammenhang mit UC noch nicht beschrieben. Diese Zellen scheinen in diesem Modell eine wichtige Rolle zu spielen, da $CD1a^+CD11b^+$ Zellen sowohl signifikant mit dem klinischen Aktivitätsscore als auch mit dem histologischen Score korrelierten (siehe Abb. 22 und Tab. 8)

Eine Studie von Kawashima *et al*. konnte zeigen, dass sowohl in gesunden Spendern als auch in Patienten mit einer Bacillus Calmette-Guerin-Infektion $CD8^+$ Zellen vorhanden sind, die sich MHC unabhängig, allein durch $CD1a^+$ Zellen aktivieren lassen. $CD8^+$ T-Zellen reagieren auf diese Aktivierung mit der Ausschüttung von IFNγ, IL-13 und IL-22 [159]. Über diesen Mechanismus könnten $CD1a^+$ Zellen einen erheblichen Teil zur Pathologie der Kolitis in diesem Modell beitragen. Bedenkt man den, in Kapitel „CD1a“ (siehe S.13) beschriebenen Zusammenhang, zur Aktivierung autoreaktiver T-Zellen durch Lipide, könnten auch Autoantigene in der Pathogenese der Kolitis im Tiermodell eine Rolle spielen.

Ein Zusammenhang zwischen einer Th2-vermittelten Erkrankung und $CD1a^+$ Zellen ist bereits von der atopischen Dermatitis bekannt, die mit einer deutlichen Erhöhung der $CD1a^+$ Zellen in der Haut einhergeht und den Th2-vermittelten Erkrankungen zugeschrieben wird. Dass sowohl $CD14^+CD1a^+$ als auch $CD11b^+CD1a^+$ Zellen im Blut der UC Patienten signifikant erhöht waren, zeigt eine wichtige Parallele zwischen Mensch und Tiermodell.

8.3.7 Charakterisierung der immunologischen Vorgänge im Kolon der Maus

Die FACS-Analyse der isolierten mononukleären Lamina propria Zellen zeigte zwei Reaktionen (siehe Abb.24). Zum einen nimmt der Anteil an $CD4^+$ T-Helferzellen ab, während der Anteil an $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen durch die Behandlung mit Ethanol zunimmt. Der Anteil an $CD14^+$ Monozyten nimmt ebenfalls ab, während der Anteil an $CD11b^+$ Zellen zunimmt. Die Behandlung mit Ethanol verschiebt das Gleichgewicht in Richtung einer zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellreaktion. Dies steht im Einklang damit, dass beschrieben wurde, dass sowohl durch $CD11b^+CD1a^+$ Zellen als auch durch $CD64^+CD14^+$ Zellen eine Aktivierung von $CD8^+$ Zellen stattfinden kann. Dass der Anteil an $CD14^+$ Zellen abfällt kann

als Reifung der Zellen gedeutet werden. $CD14^+$ Monozyten wandern aus dem Blut in den Darm ein und verlieren mit zunehmendem Reifungsgrad CD14, während sie gleichzeitig beginnen CD11b zu exprimieren.

Fazit

Die gefundenen Zellpopulationen können dazu dienen LPS an der Oberfläche zu präsentieren. Zusammen mit einem Barriereverlust, der durch die Proteindenaturierung durch Ethanol hervorgerufen wurde, könnte LPS ein Trigger zur Auslösung der Kolitis in diesem Modell sein, da Ethanol in der verwendeten Konzentration von 50% bakterizid wirkt [160].

Die Stimulierung von $CD14^+$ Zellen durch LPS und freiwerdende Epithelproteine scheint jedoch nur einen Teil der Entzündungskaskade auszumachen. Neben diesen Zellen sind auch $CD1a^+CD14^+$, $CD1a^+CD11b^+$ und $CD64^+CD14^+$ Zellen an der Entzündung in diesem Modell beteiligt. Auch diese Zellen sind monozytären Ursprungs, haben aber in mehreren *in vitro* Studien ein sehr hohes Maß an T-Zellaktivierung gezeigt. $CD1a^+$ und $CD64^+$ Zellen können zudem über die Präsentation von Lipiden und Immunkomplexen die Aktivierung von autoreaktiven $CD8^+$ Zellen auslösen [161, 162].

Da $CD1a^+$ und $CD64^+$ Zellen in diesem Modell einen signifikanten Einfluss auf den Schweregrad der Erkrankung hatten (siehe Tab.8) und eine erhöhte $CD8^+$ Population in der Milz der Maus und im Kolon nachgewiesen werden konnte, könnte eine autoreaktive T-Zellreaktion ebenfalls eine Rolle spielen. Im Zusammenhang mit UC wurden Autoantikörper gegen pANCA, GM-CSF und Becherzellen beschrieben [163-165].

Ein weiterer Hinweis auf den Einfluss dieser Zellen kommt von der Analyse der Spender, mit denen die Tiere rekonstituiert wurden. Der klinische Aktivitätsscore der Tiere war in den Versuchen mit den Spendern 58 und 59 am niedrigsten. Diese Spender hatten unterdurchschnittlich wenige $CD1a^+CD11b^+$ und $CD8^+CD44^+CD62L^+$ Zellen. Der Einfluss von Autoantikörpern und das mitgegebene „Gedächtnis“ dieser Zellen könnten diesen Zusammenhang erklären. Dennoch bleibt durch dieses Studiendesign unklar welche T-Zellpopulationen durch $CD1a^+$ und $CD64^+$ aktiviert werden und ob die pathologischen Effekte in diesem Modell durch $CD8^+$ Zellen und Autoantikörper vermittelt werden.

Eine Hypothese zu den Vorgängen in diesem Modell ist in Abbildung 33 schematisch dargestellt.

Die dargestellten Vorgänge könnten auch an der Pathologie von UC im Menschen beteiligt sein, da diese Zellpopulationen auch im entzündeten Kolon von UC Patienten erhöht waren.

Die Hypothese 2.1 konnten bestätigt werden. Die Hypothese 2.2 konnte in den Zellpopulationen $CD4^+$, $CD4^+CD44^+CD62L^+$, $CD8^+CD44^+CD62L^+$, $CD64^+CD64^+$ und $CD163^+CD14^+$ nicht bestätigt werden. Die Hypothesen 2.3 und 2.4 konnte bestätigt werden.

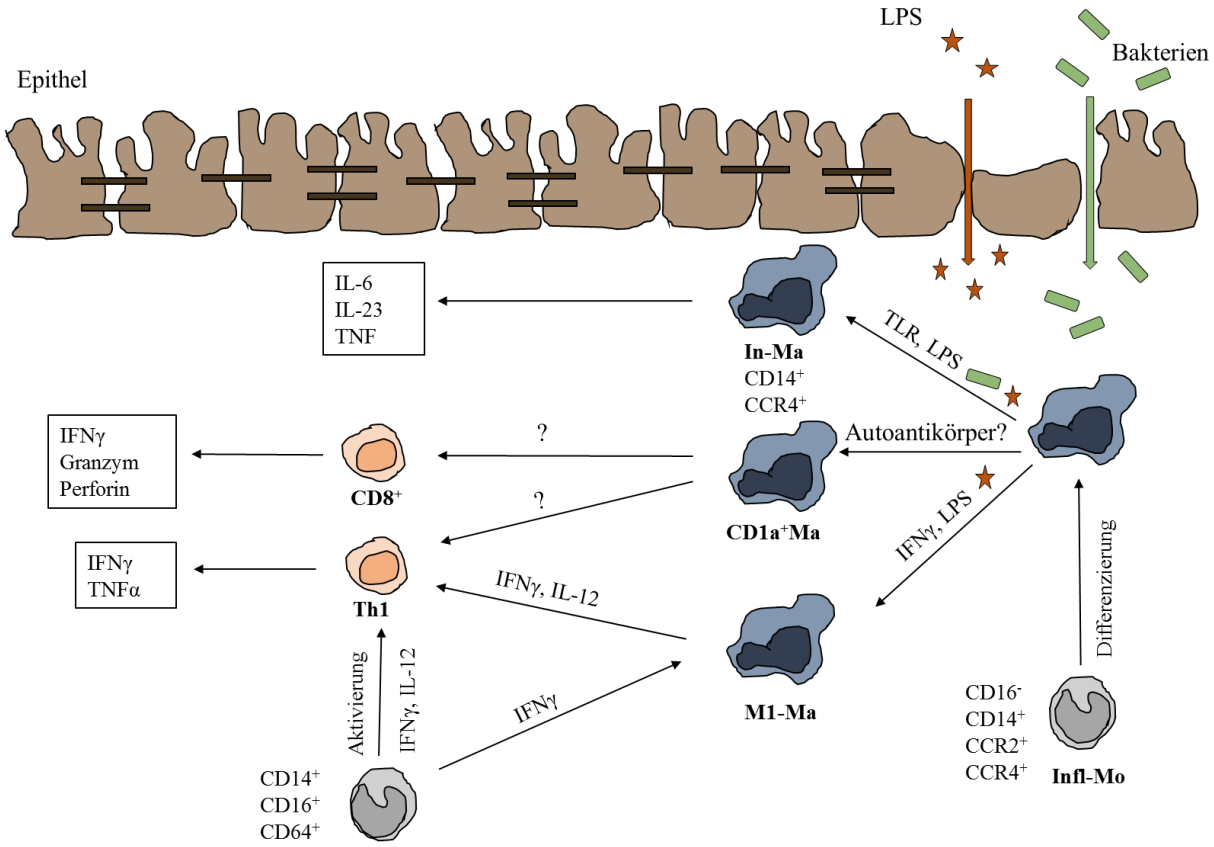


Abbildung 33: Hypothese zu den Vorgängen durch die Kolitisauslösung.
Durch die rektale Gabe von Ethanol kommt es zum Barriereverlust im Epithel. Somit können Bakterien in die Lamina propria eindringen und aktivieren über TLR Innate Makrophagen(In-Ma). In-Ma reagieren mit der Ausschüttung von IL-6, IL-23, TNF. Aus der Zellwand gram- Bakterien wird durch Ethanol LPS frei, das M1 Makrophagen (Ma1-Ma) aktiviert. Ma1-Ma aktivieren Th1 Zellen. Th1 Zellen können aber auch alternativ durch $CD64^+CD14^+$ Zellen aktiviert werden. Unklar ist auf welche Weise $CD1a^+$ Zellen angelockt bzw. aktiviert werden. Sie können in vitro $CD8^+$ zytotoxische Zellen aktivieren.

8.4 Ziel III.: Effekte durch Infliximab

8.4.1 Hypothesen 3.1 -3.3: Die Wirkung von Infliximab auf die klinische Aktivität

Der klinische Aktivitätsscore der Tiere in der Ethanol + Infliximab Gruppe war deutlich, aber nicht signifikant, niedriger als in der Ethanol + NaCl Gruppe (siehe Abb.25). Wie in der ROC Kurvenanalyse (siehe Abb.15) dargestellt, ist der histologische Score der bessere Parameter zur Bewertung der Krankheitsaktivität.

Verglichen mit der Ethanol + NaCl Gruppe hatten die Tiere der Ethanol + Infliximab Gruppe einen signifikant geringeren histologischen Score. Dennoch zeigten auch diese Tiere Veränderungen im Kolon. Zudem zeigten sie häufiger fibrotische Veränderungen in der histologischen Bewertung (siehe Abb.27). Auch Patienten, die mit Infliximab behandelt

werden, können klinisch gesund sein, aber ein chronisch-entzündliches Profil in der FACS-Analyse zeigen (Föhlinger *et al.* Paper in Review [117]).

Fazit

Infliximab führte zu einer signifikanten Reduktion der Krankheitsaktivität, wenn man sich auf den histologischen Score als sensitivste und spezifischste Methode zur Evaluierung der klinischen Krankheitsaktivität verlässt. Der verwendete TNFα Inhibitor ist ein chimärischer Antikörper und besitzt sowohl murine als auch humane Domänen. Er zeigt jedoch keinerlei Kreuzreaktion mit anderen Spezies als dem Menschen [166]. Außerdem lag der Anteil muriner $CD45^+$ Zellen an den Gesamtleukozyten in allen Versuchen in einem Bereich von

0 - 1% (Daten nicht gezeigt). Damit ist es ausgeschlossen, dass Infliximab über eine Blockade muriner Zellen zu einer Verbesserung der klinischen Aktivität führte.

Die Hypothesen 3.1-3.3 konnten bestätigt werden.

8.4.2 Hypothesen 3.4 - 3.5: Die Wirkung von Infliximab auf das immunologische Profil

Die Zellpopulationen, die im Tiermodell in der Ethanol + NaCl Gruppe signifikant erhöht waren, konnten durch die Behandlung mit Infliximab wieder in Richtung Ausgangssituation (Kontrollgruppe) gesenkt werden (siehe Abb. 28 und Abb.29).

Untersucht man die $CD4^+$ Zellpopulation genauer, konnte ein Anstieg an $CD62L^+$, also naiven Zellen, im Verhältnis zu aktivierten Zellen festgestellt werden. Dies steht im Einklang mit anderen Studien, in denen *in vitro* gezeigt werden konnte, dass Infliximab im Beisein von Monozyten oder unreifen DC zu einer Blockade der T-Zellaktivierung führt. Die Wirkung von Infliximab erfolgt nur in Ausnahmefällen über die Apoptose von T-Zellen [167, 168].

Die Expression von CD1a konnte sowohl auf $CD14^+$ als auch auf $CD11b^+$ Zellen durch die Gabe von Infliximab gesenkt werden. Der Effekt wird von Bedini *et al.* bestätigt. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Infliximab *in vitro* die Antigenpräsentations-Kapazität von Dendritischen Zellen senkt indem diese Zellen weniger CD1a auf ihrer Oberfläche exprimieren. CD1a blieb auch dann reduziert, als die Zellen durch LPS stimuliert wurden [167] .

In mehreren Arbeiten wurde beschrieben, dass die Wirkung von Infliximab auf die Hochregulierung regulatorischer Makrophagen zurückzuführen ist, die vor allem durch die Expression der Marker CD206 und CD68 gekennzeichnet sind [168, 169]. In dieser Studie konnten in der Ethanol + Infliximab Gruppe vermehrt fibrotische Veränderungen festgestellt werden, obwohl keine Effekte auf $CD206^+$ Zellen messbar waren (Daten nicht gezeigt).

Dafür kann es mehrere Gründe geben. Zum einen fand die Euthanasie der Tiere bereits 2 Tage nach der letzten Applikation statt. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Tiere noch in einer

akuten Erkrankungsphase und die Vorgänge während des Heilungsprozesses durch Infliximab waren möglicherweise noch nicht voll sichtbar. Auch die histologisch nachweisbare Fibrose war nur in kleinen Bereichen zwischen einzelnen Krypten vorhanden, aber nicht generalisiert und in einem Ausmaß wie zum Beispiel von Fichtner-Feigl *et al.* in einem TNBS Kolitis Modell beschrieben [105]. Zum anderen wurde der Anteil der $CD206^{+}CD14^{+}$ in diesem Experiment aus der Milz der Mäuse bestimmt. In den oben genannten Veröffentlichungen wurde diese Zellpopulation entweder immunhistochemisch bestimmt, oder es wurden Lamina propria Zellen in Zellkultur untersucht. Da anzunehmen ist, dass Makrophagen häufiger im Zielgewebe anzutreffen sind als in der Milz, könnte das Fehlen dieser Zellpopulation auch eine methodische Ursache haben.

In Studien unserer Arbeitsgruppe (Paper in Review, [170]) konnte jedoch gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von TGFβ im Kolon der Maus durch die Gabe von Infliximab nach der Kolitisauslösung auf einem hohen Niveau blieb, während die Expression von HGF und TARC signifikant sank. Dies bestätigt die histologisch sichtbare Fibrose und das vermehrte Auftreten von regulatorischen Zellen, obwohl kein $CD206^{+}CD14^{+}$ Anstieg nachweisbar war.

Fazit

Infliximab scheint im Tiermodell durch die Blockade einer akuten Immunantwort, die von $CD64^{+}CD14^{+}$, $CD1a^{+}CD14^{+}$, $CD1a^{+}CD11b^{+}$, $CCR4^{+}CD14^{+}$, HGF und TARC geprägt wird, zu wirken. Gleichzeitig verschiebt es das Gleichgewicht zu Gunsten einer chronischen Ummodellierungsreaktion, die von regulatorischen Zellen und TGFβ vermittelt wird und zu fibrotischen Veränderungen führt (siehe Abb.27). Die Hypothesen 3.4 - 3.5 konnten bestätigt werden

In einer Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die gerade beschriebenen Entzündungsphasen auch im UC Patienten ein Gleichgewicht bilden. In den Remissionsphasen und durch die Gabe eines TNFα Inhibitors liegt das Gleichgewicht auf der chronischen Phase der Ummodellierung. Die Expression von TARC und HGF im Serum sinkt, während der Spiegel von TGFβ im Serum und im Kolon steigt. Gleichzeitig steigt der Serumspiegel von Periostin, ein Chemokin, das durch IL-13 induziert wird. Periostin stimuliert TGFβ abhängige Signalwege, induziert die Sekrektion von Kollagen und fördert den Umbau des Bindegewebes [171].

Verlagert sich dieses Gleichgewicht zu Gunsten einer akuten Entzündung kommt es zu den typischen klinischen Manifestationen. In diesem Fall steigt die Expression von TARC und HGF und die Expression von TGFβ sinkt [117]

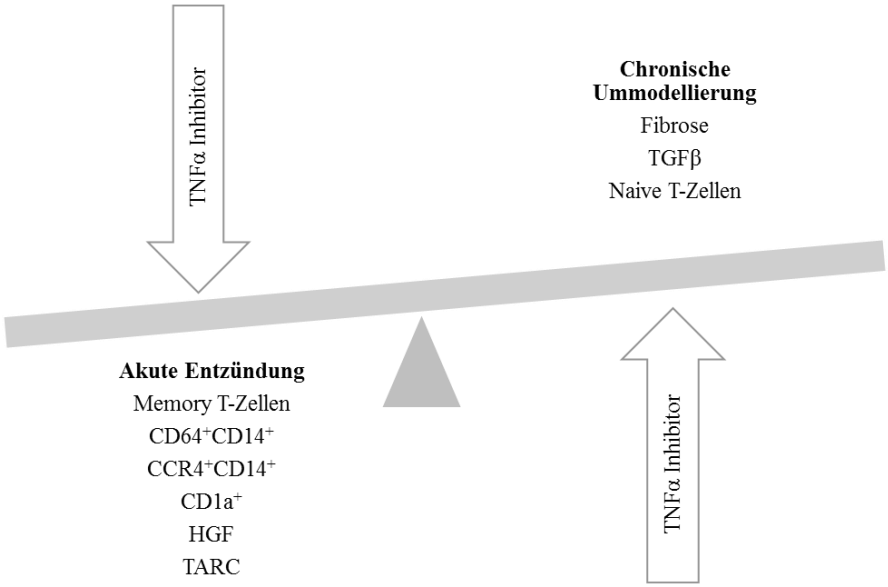


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Wirkung von Infliximab in diesem Modell. Durch die Blockade von TNFα verschiebt sich das Gleichgewicht zu Gunsten einer chronischen Ummodellierung. Dies führt zu einer Verbesserung der klinischen Aktivität der Erkrankung.

8.5 Ziel IV.: Effekte durch Pitrakinra

8.5.1 Hypothesen 4.1 – 4.3: Die Wirkung von Pitrakinra auf die klinische Aktivität

Die Gabe von Pitrakinra führte nicht zu einer Verbesserung des klinischen Aktivitätsscore. Dies widerspricht unserer ursprünglichen Erwartung, steht jedoch im Einklang mit einer Veröffentlichung von Reinisch *et al.* In dieser Studie wurde ein monoklonaler Antikörper gegen IL-13, Anrukinzumab, multizentrisch und doppelt-blind in UC Patienten getestet (klinische Phase II Studie). Dabei hatte Anrukinzumab keinerlei positiven Effekt auf die klinische Aktivität der Krankheit, obwohl nachgewiesen werden konnte, dass der Antikörper mit hoher Affinität an IL-13 gebunden hat [172].

Im Tiermodell hatte sich das histologische Bild gegenüber der der Ethanol + NaCl Gruppe nicht verbessert und war geprägt von einer akuten Entzündungsreaktion und einer Einwanderung lymphozytärer Zellen in das umgebende mesenteriale Gewebe. Im Gegensatz zur Therapie mit Infliximab waren keine chronischen Reaktionen, wie zum Beispiel Fibrose, sichtbar (siehe Abb. 31). Die Hypothesen 4.1 – 4.3 konnten nicht bestätigt werden.

8.5.2 Hypothese 4.4: Die Wirkung von Pitrakinra auf das immunologische Profil

Die Zellpopulationen, die in der Ethanol + NaCl Gruppe signifikant erhöht waren, konnten durch Pitrakinra nicht gesenkt werden. Die $CCR4^+CD14^+$ Zellen, $CCR4^+CD11b^+$ und $CD1a^+CD11b^+$ Zellen, stiegen sogar weiter an. Zusätzlich war in allen T-Zellpopulationen ein signifikanter Anstieg zu beobachten (siehe Abb.32). Davon betroffen waren vor allem die Subpopulationen der $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen, die bereits Antigenkontakt hatten.

Eine alleinige Unterdrückung der Th2-Reaktion scheint das Gleichgewicht in Richtung einer vermehrten Reaktion durch aktivierte und zytotoxische T-Zellen zu verschieben. Der signifikante Anstieg an $CCR4^+CD14^+$ und $CCR4^+CD11b^+$ Zellen weist zudem auf eine vermehrte Expression des proinflammatorischen Chemokins TARC hin. TARC korreliert positiv mit einem hohen SCAAIS Score in den UC Patienten (Föhlinger *et al.*, Paper in Review [117]).

In der mRNA-Analyse des Kolons der Mäuse zeigten die Tiere aus der Ethanol + Pitrakinra Gruppe einen signifikanten Anstieg von TARC und HGF, während TGFβ abfiel. Dieser Effekt war genau umgekehrt zum Effekt von Infliximab und bestätigt die hohe klinische Aktivität durch eine akute Entzündungsreaktion [170].

Pitrakinra führte durch die Blockade der chronischen Ummodellierung, die vor allem durch regulatorische Zellen und TGFβ gekennzeichnet ist, zu einer akuten Entzündungsreaktion und einer hohen klinischen Aktivität. Die Hypothese 4.4 konnte bestätigt werden.

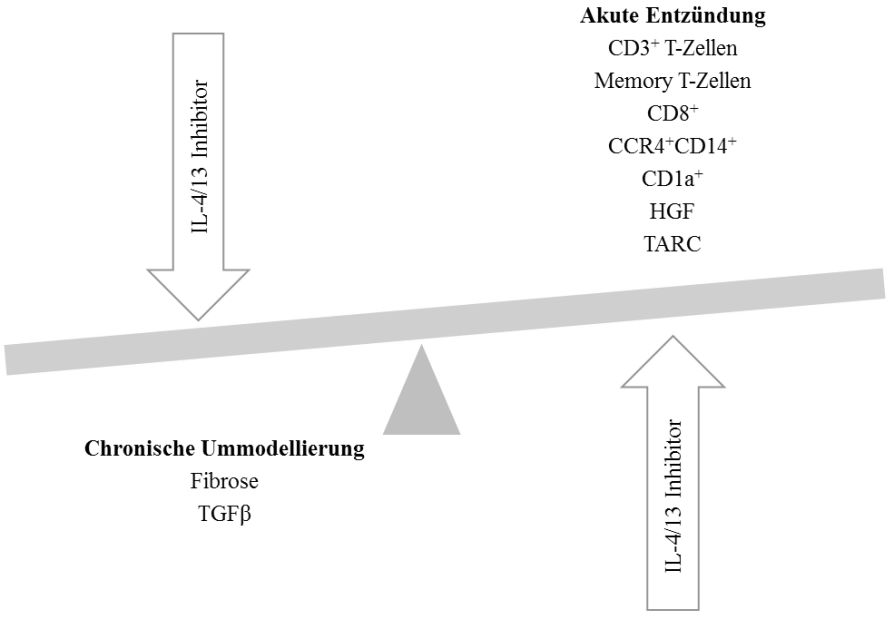


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Wirkung von Pitrakinra in diesem Modell.
Durch die Blockade von IL-4 und IL-13 verschiebt sich das Gleichgewicht zu Gunsten der akuten Entzündung. Dies führt zu einer Verschlechterung der klinischen Aktivität der Erkrankung.

Fazit

Die Tatsache, dass ein IL-4/13 Inhibitor weder den klinischen, noch den histologischen Score verbessern konnte spricht dagegen, dass die Erkrankung in diesem Modell allein durch IL-4 oder IL-13 vermittelt wird, und dass es sich um eine klassische Th2-Reaktion handelt. Die Unterbindung der Th2-Reaktion scheint das T-Zellgleichgewicht in diesem Modell nicht nur in Richtung einer akuten T-Zelltoxizität zu verschieben, sondern auch insgesamt die klonale Expansion der T-Zellen im Tiermodell zu steigern. Dies wird deutlich wenn man den signifikanten Anstieg zytotoxischer $CD8^+$ Zellen und $CD3^+$ T-Zellen betrachtet.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass der Erhalt eines Gleichgewichts aus akuter Entzündung und chronischer Ummodellierungreaktion essentiell für die Therapie einer UC in diesem Tiermodell ist. Während Infliximab durch die Blockade der akuten Entzündung in eine chronische Phase führt und die klinische Aktivität senkt (siehe Abb.34), blockiert Pitrakinra die chronische Entzündung und verschiebt damit das Gleichgewicht hin zu einer akuten Entzündung (siehe Abb.35).

8.6 Evaluierung der Übertragbarkeit auf den Menschen

Dieses Modell stellt eine Balance zwischen akuter Entzündung, die durch $CD64^+CD14^+$, $CD1a^+CD14^+$, $CD1a^+CD11b^+$, $CCR4^+CD14^+$, HGF und TARC geprägt wird und der Auflösung der Entzündung, die durch TGFβ vermittelt wird und sich in einer Fibrose äußert, dar. Derselbe Zusammenhang, zwischen HGF, TARC und TGFβ unter dem Einfluss von Infliximab, ließ sich im Tiermodell und im Mensch nachweisen [117].

Im Gegensatz zur Situation im Menschen konnte in der Maus kein Effekt auf die $CD294^+$ (CRTH2) Zellpopulation nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass dieses Modell eine frühe Phase der Kolitis darstellt, aber nicht die klassische Th2-Immunreaktion wie sie zum Beispiel von Heller *et al*. für das Oxazalon-Model beschrieben wurde [173]. Auch die unterschiedliche Entwicklung der $CD4^+$ und $CD4^+CD44^+CD62L^+$ Zellen und $CD8^+CD44^+CD62L^+$ Zellen in der Maus und den humanen PBMC zeigt, dass das Modell in der Abbildung der $CD4^+$ Reaktion Schwächen hat.

Der auslösende Trigger in diesem Modell, eine Epithelschädigung mit folgendem Barriereverlust und möglicherweise Autoantikörper werden in der Literatur zur Pathogenese von UC ausführlich diskutiert und immer wieder damit in Zusammenhang gebracht [27, 161, 163, 164, 174].

8.7 Ausblick

Durch die vergleichsweise milde Form der Kolitis sollte es möglich sein, die Mäuse auch in eine chronische Phase der Entzündung zu überführen, die das Krankheitsbild UC noch besser darstellt. Die Chronizität des Systems wird durch die Entstehung einer *graft versus host disease* eingeschränkt. Eine Arbeit von Ali *et al.* gibt für rekonstituierte NOD-Scid IL2Rγ^{null} Mäuse eine mediane Überlebenszeit von 40 Tagen an [150]. Es sollte mit einem angepassten Versuchsprotokoll möglich sein die Tiere über einen längeren Zeitraum (Versuchsdauer 28-35 Tage) in einer Phase der chronischen Kolitis zu halten.

In einem chronischen Modell sollte auch der Einfluss regulatorischer $CD206^+CD163^+CD14^+$ Makrophagen besser untersuchbar sein.

In diesem Modell blieb die Funktion der $CD1a^+$ und $CD64^+$ Zellen unklar. Über die Mechanismen, die diese Zellpopulationen mit einer hohen klinischen Aktivität verbinden, kann nur mit Hilfe von Ergebnissen aus Zellkulturstudien spekuliert werden. Da $CD1a^+$ und $CD64^+$ Zellen, nicht nur im Tiermodell, sondern auch im UC Patienten, nachgewiesen werden konnten, sollten die Funktion und die Aktivierungswege dieser Zellen in weiteren Studien genauer charakterisiert werden.

8.8 Stärken und Schwächen des Modells

Eine der prinzipiellen Schwächen dieses Tiermodells ist die Entwicklung einer *graft versus host disease*, die von einigen Autoren bereits 3-4 Wochen nach der Rekonstitution mit den humanen Zellen beschrieben wurde. Die Reaktion geht dabei von humanen T-Zellen aus, die eine starke Reaktion auf die MHC I und II Moleküle der Maus zeigen [175]. Durch die Wahl geeigneter Versuchsbedingungen konnten wir dieses Problem in diesen Versuchen vermeiden.

Auch wenn es gelingt in diesem Modell ein Versuchsprotokoll über eine Dauer von 35 Tagen zu etablieren, ist die Vergleichbarkeit mit einer Krankheit, die über Jahre und Jahrzehnte beim Patienten besteht, eingeschränkt.

In diesem Modell werden die Tiere mit humanen PBMC rekonstituiert. Durch den Prozess der PBMC Isolierung gehen Immunzellen verloren. Vor allem neutrophile und eosinophile Granulozyten werden durch die Isolierung abgereichert. Neutrophile Granulozyten sind jedoch ein wesentliche Bestandteil der Erkrankung UC im Patienten.

Ein weiteres Problem, das allen Arbeiten mit humanisierten Mäusen gemein ist, ist die hohe Variabilität des Systems. Jeder Spender bringt ein anderes immunologisches Profil mit, und dies führt im Vergleich zu anderen Tiermodellen zu einer zusätzlichen Quelle von Variabilität. Dies erhöht nicht nur die Zahl der Tiere, die im Versuch zur Testung eingesetzt werden müssen, sondern auch die Kosten.

Die hohe Variabilität ist gleichzeitig eine der größten Stärken des Systems, gibt sie doch die Situation im Patienten theoretisch genauer und detailgetreuer wieder als konventionelle Tierstudien mit genetisch standardisierten Mäusen. Damit könnten Versuche in diesem Modell die Übertragbarkeit auf spätere klinische Studien erhöhen. Trotz der hohen Variabilität waren die Therapieeffekte durch Infliximab und Pitrakinra reproduzierbar. Dies legt nahe, dass das Tiermodell zur Testung von Inhibitoren, die hohe Sequenzhomologien erfordern, verwendet werden kann.

8.9 Limitationen dieser Arbeit

Eine der Limitationen dieser Arbeit ist die geringe Anzahl an analysierten humanen Kolonproben. Da in dieser Studie Vollwand-Kolonproben untersucht wurden, konnten im Zeitraum dieser Dissertation insgesamt 9 Proben gewonnen werden. Die Kolonproben, die als „gesund“ betrachtet wurden, stammten von Patienten, deren Kolon auf Grund eines Tumors reseziert wurde. Auch wenn das Gewebe aus einem unveränderten Bereich entnommen wurde und makroskopisch als „gesund“ eingestuft wurde ist davon auszugehen, dass es durch die Malignität zu einem Einstrom von Entzündungs-Zellen kam. Dies erschwert die Unterscheidung zwischen „gesund“ und UC Patient. Die Anzahl der Proben von Kolitis Patienten von n=2 erlaubt keine statistischen Vergleiche zwischen den Patienten. Die Befunde sind aber teilweise so eindeutig, dass sie präsentiert werden sollten.

Ein weiteres Problem ist, wie oben beschrieben, die hohe Variabilität des Systems. Diese macht selbst bei eindeutig sichtbaren Effekten im Einzelversuch die Auswertung für alle Versuche schwierig, da sich Subpopulationen in der FACS-Analyse zwar gleich verhalten, aber die übergeordnete Population in unterschiedlicher Menge vorhanden ist. Dies führt bei gemeinsamer Auswertung aller Versuche zu sehr hohen Standardabweichungen in der Primärpopulation ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD14^+$, $CD\ 11b^+$, $CD3^+$).

9 ZUSAMMENFASSUNG

Charakterisierung eines neuen Colitis ulcerosa Modells in NOD Scid IL2Rγ Chain^{Null} Mäusen mit humanisiertem Immunsystem

Colitis ulcerosa (UC) gehört zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und ist gekennzeichnet durch einen chronisch-rezidivierenden Verlauf. Die Patienten sind bei Diagnosestellung häufig sehr jung und auf Grund der Chronizität der Erkrankung benötigen sie eine lebenslange Therapie. Mittel der Wahl sind in erster Instanz Kortikosteroide, die starke Nebenwirkungen haben und häufig keine Remission erhalten können. Auch der momentan zuverlässigste Wirkstoff auf dem Markt, der TNFα Inhibitor Infliximab, kann nicht bei allen Patienten eine Remission erhalten.

Die Entwicklung neuer Wirkstoffe gestaltet sich schwierig, und in der Entwicklung von Medikamenten aus den Wirkstoffgruppen *small molecules* oder *biologicals*, die sehr spezifisch wirken, zeigt sich eine mangelhafte Übertragbarkeit aus dem Tiermodell auf spätere klinische Phase II Studien. Genetisch standardisierte Mäuse können nicht die heterogene Patientenpopulation widerspiegeln, und durch die Unterschiede in der Proteinstruktur zwischen Mensch und Maus können Ergebnisse, die sich auf spezifisch bindende *biologicals* beziehen, nicht einfach auf den Mensch übertragen werden. Im schlimmsten Fall führt dies nicht nur zu hohen Kosten in der Wirkstoffentwicklung, sondern auch zu tragischen Zwischenfällen, wenn der Wirkstoff das erste Mal im Menschen erprobt wird.

Mäuse mit humanisiertem Immunsystem könnten ein Krankheitsmodell mit humanen Rezeptoren darstellen und damit besser geeignet sein um die feinen Immunantworten zu charakterisieren. In unserem Tiermodell wurden NOD-Scid IL2Rγ-chain^{null} Mäusen (NSG) mit peripheren mononukleären Zellen (PBMC) von Spendern rekonstituiert, die an UC erkrankt waren. Durch die rektale Gabe von 50% Ethanol wurde eine Kolitis etabliert. Der Grad der klinischen Aktivität im Tier war vom Spender abhängig.

Von den Tieren, die mit Ethanol behandelt wurden, entwickelten 90 % eine Kolitis. Das histologische Bild entsprach dem einer milden Kolitis. In den Gruppen, die mit Ethanol behandelt wurden, waren die CD64^{+}CD14^{+}, CD1a^{+}CD14^{+}, CD1a^{+}CD11b^{+} erhöht. Diese Zellen haben das Potential autoreaktive T-Zellen zu aktivieren und es besteht der Verdacht, dass Autoantikörper eine Rolle in diesem Tiermodell spielen könnten. Der Verdacht wird durch den Anstieg von CD8+ und CD8+ *central memory* Zellen erhärtet. Autoantikörper könnten auch die Spendervariabilität erklären.

Um das Modell zu validieren wurde der TNFα Inhibitor Infliximab getestet. Die therapierten Tiere zeigten einen geringeren klinischen und histologischen Score als die Kontrollen ohne

Therapie. Die oben genannten Zellpopulationen fielen in ihrem Anteil oder gingen auf das Ausgangsniveau zurück.

Da UC klassischerweise als Th2-vermittelte Erkrankung beschrieben ist, wurde in diesem Model das spezifische IL-4 Mutein Pitrakinra als Inhibitor der IL-4/ 13 Kaskade getestet. Dabei handelt es sich um ein IL-4 Protein, das durch zwei Punktmutationen gegenüber IL-4 verändert wurde. Es bindet an die IL-4Rα Kette und verhindert dort die Bildung eines Effektorkomplexes.

Die Behandlung mit Pitrakinra führte in unserem Modell nicht zu einer Verbesserung des klinischen oder histologischen Scores. Im Gegenteil, die Tiere verloren mehr Gewicht und die Letalität war höher als in den Gruppen, die nicht mit Pitrakinra behandelt wurden. In der FACS-Analyse zeigte sich, dass in den $CD1a^{+}CD11b^{+}$ Zellen und T-Zell Populationen ein signifikanter Anstieg sichtbar war.

Die Blockade der Th2-Polarisierung scheint das Gleichgewicht in Richtung einer zytotoxischen T-Zellreaktion zu verschieben und eben diese Reaktion war mit einem höheren klinischen Aktivitätsscore verknüpft. Dies passt zu einer klinischen Phase II Studie, in der der IL-13 Antikörper Anrukinzumab keinerlei positiven Effekte auf die klinischen Symptome der behandelten UC Patienten hatte, obwohl er nachweislich an IL-13 gebunden hat [172].

Gleichzeitig mit den Tierstudien wurde aus Blut und Lamina propria Zellen aus dem Kolon von UC Patienten ein immunologisches Profil erstellt. Es zeigte sich, dass das immunologische Profil im Tiermodell zum größten Teil mit dem immunologischen Profil im erkrankten humanen Kolon, jedoch nicht immer mit dem immunologischen Profil im Blut der Patienten übereinstimmt.

Wir konnten zeigen, dass in diesem Mausmodell humane Rezeptoren adressiert werden können, und dass das Modell sich zur Testung neuartiger Inhibitoren eignet. Das Modell wirft zudem ein neues Licht auf ein empfindliches Gleichgewicht in den entzündlichen Vorgängen und die Rolle einer möglichen Autoreaktivität in der Pathogenese der UC.

10 SUMMARY

Characterization and validation of an ethanol induced mouse model for ulcerative colitis using NSG mice

Ulcerative Colitis (UC) is one of two major inflammatory bowel diseases. Patients are often young and due to the chronicity of the disease, lifelong treatment is necessary. There is a lack of successful medication when patients do not respond to the last choice drug, a TNFα antibody, infliximab. Developing new drugs in this field is difficult because genetically standardized mice do not mimic the heterogeneous patient group or the finely modulated responses within the immune system. This often leads to failure of small molecules or biologicals in phase II trials even though they achieved proof of concept in animal studies. Obviously, there is a need for better animal models. Working with humanized mice might fill this gap.

In this study we engrafted NSG mice with PBMC of UC patients and induced colitis symptoms by rectal application of 50% ethanol. Mice developed a severe clinical score, even though the histological evaluation showed milder changes in colon architecture than in comparable DSS models. In FACS analysis mice challenged with ethanol showed an increase in $CD64^+CD14^+$, $CD1a^+CD14^+$, $CD1a^+CD11b^+$. Since these cells have the capability to activate autoreactive T cells there is suspicion that autoimmunity might become important in this model. Compatible with this idea is an increase in $CD8^+$ T cells and $CD4^+CD44^+CD62L^+$ central memory T-cells.

To validate the model, we treated a group of ethanol challenged mice with the TNFα-Inhibitor infliximab. Mice showed less of a clinical score and significantly less morphologic changes in the histologic evaluation. All cell populations described above dropped to almost normal levels.

As UC is considered a Th2 driven immune response we also tested a specific mutein for the IL-4Rα chain, pitrakinra. Treatment with pitrakinra did not result in a better clinical or histological score. Mice lost more weight than challenged and untreated mice and mortality was higher. In FACS analysis these mice showed a significant increase in $CD4^+$, $CD8^+$, $CD3^+$, Memory T-cells. Most macrophage/monocyte populations were on the same level as in ethanol-challenged, but untreated mice. Exceptions were $CCR4^+CD14^+$ and $CCR4^+CD11b^+$ monocytes. These cells are considered inflammatory monocytes and they were significantly enhanced as well. This finding matches our observation that UC patients express more of the cytokine TARC (ligand for CCR4) when out of remission. It seems that blocking Th2 reaction leads to an acute cytotoxic T-cell reaction and is therefore enhancing colitis symptoms. This observation fits a clinical phase II trial of anrukinzumab, an antibody against IL-13, that did not show any beneficial effects for UC patients.

Simultaneously to the animal studies we developed a FACS staining panel to evaluate the immunological profile of UC patients compared to healthy donors. Blood samples and colon samples were analysed. Immune responses in the animals corresponded to the reactions taking place in the gut of UC patients, but not always with blood samples. Even though there was a high variability between different donors in the animal studies, macrophage and T-cell reactions upon treatment with different inhibitors were reproducible.

The variability as the biggest weakness of this model might as well be this model's biggest strength because it reflects the heterogonous patients better than conventional animal models. We are confident that that we have developed a valid model which allows us to further examine the balance of inflammatory conditions in UC and sheds new light on autoimmunity in UC.

.

11 LITERATURVERZEICHNIS

1. Bernstein, C.N., et al., *The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study.* Am J Gastroenterol, 2006. **101**(7): p. 1559-68.

2. Rocchi, A., et al., *Inflammatory bowel disease: a Canadian burden of illness review.* Can J Gastroenterol, 2012. **26**(11): p. 811-7.

3. Molodecky, N.A., et al., *Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review.* Gastroenterology, 2012. **142**(1): p. 46-54.e42; quiz e30.

4. Dignass, A., et al., *[Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011].* Z Gastroenterol, 2011. **49**(9): p. 1276-341.

5. Jacobsen, B.A., et al., *Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978-2002.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006. **18**(6): p. 601-6.

6. Jostins, L., et al., *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease.* Nature, 2012. **491**(7422): p. 119-24.

7. Childers, R.E., et al., *Family history of inflammatory bowel disease among patients with ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis.* J Crohns Colitis, 2014. **8**(11): p. 1480-97.

8. Halfvarson, J., et al., *Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics.* Gastroenterology, 2003. **124**(7): p. 1767-73.

9. Halfvarson, J., *Genetics in twins with Crohn's disease: less pronounced than previously believed?* Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(1): p. 6-12.

10. Schmitt, J., et al., *Atopic dermatitis is associated with an increased risk for rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease, and a decreased risk for type 1 diabetes.* J Allergy Clin Immunol, 2015.

11. Powell, J.J., et al., *Immune potentiation of ultrafine dietary particles in normal subjects and patients with inflammatory bowel disease.* J Autoimmun, 2000. **14**(1): p. 99-105.

12. Bernstein, C.N. and F. Shanahan, *Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases.* Gut, 2008. **57**(9): p. 1185-91.

13. Shanahan, F. and C.N. Bernstein, *The evolving epidemiology of inflammatory bowel disease.* Curr Opin Gastroenterol, 2009. **25**(4): p. 301-5.

14. Gent, A.E., et al., *Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy.* Lancet, 1994. **343**(8900): p. 766-7.

15. Lopez-Serrano, P., et al., *Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study.* Scand J Gastroenterol, 2010. **45**(12): p. 1464-71.

16. Castiglione, F., et al., *Risk factors for inflammatory bowel diseases according to the "hygiene hypothesis": a case-control, multi-centre, prospective study in Southern Italy.* J Crohns Colitis, 2012. **6**(3): p. 324-9.

17. Calkins, B.M., *A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease.* Dig Dis Sci, 1989. **34**(12): p. 1841-54.

18. Mahid, S.S., et al., *Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis.* Mayo Clin Proc, 2006. **81**(11): p. 1462-71.

19. Higuchi, L.M., et al., *A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women.* Am J Gastroenterol, 2012. **107**(9): p. 1399-406.

20. Porter, C.K., et al., *Infectious gastroenteritis and risk of developing inflammatory bowel disease.* Gastroenterology, 2008. **135**(3): p. 781-6.

21. Garcia Rodriguez, L.A., A. Ruigomez, and J. Panes, *Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease.* Gastroenterology, 2006. **130**(6): p. 1588-94.

22. Gradel, K.O., et al., *Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis.* Gastroenterology, 2009. **137**(2): p. 495-501.

23. Henderson, P., et al., *Genetics of childhood-onset inflammatory bowel disease.* Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(1): p. 346-61.

24. Henderson, P., et al., *Function of the intestinal epithelium and its dysregulation in inflammatory bowel disease.* Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(1): p. 382-95.

25. McGuckin, M.A., et al., *Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases.* Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(1): p. 100-13.

26. Dotan, I., et al., *Intestinal epithelial cells from inflammatory bowel disease patients preferentially stimulate CD4+ T cells to proliferate and secrete interferon-gamma.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(6): p. G1630-40.

27. Salim, S.Y. and J.D. Soderholm, *Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases.* Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(1): p. 362-81.

28. Turner, J.R., *Intestinal mucosal barrier function in health and disease.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 799-809.

29. Van der Sluis, M., et al., *Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection.* Gastroenterology, 2006. **131**(1): p. 117-29.

30. Fagarasan, S. and T. Honjo, *Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 63-72.

31. Suzuki, K., et al., *Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 1981-6.

32. van der Flier, L.G. and H. Clevers, *Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium.* Annu Rev Physiol, 2009. **71**: p. 241-60.

33. Dupaul-Chicoine, J., M. Dagenais, and M. Saleh, *Crosstalk between the intestinal microbiota and the innate immune system in intestinal homeostasis and inflammatory bowel disease.* Inflamm Bowel Dis, 2013. **19**(10): p. 2227-37.

34. Cario, E. and D.K. Podolsky, *Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease.* Infect Immun, 2000. **68**(12): p. 7010-7.

35. Su, L., et al., *TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis.* Gastroenterology, 2013. **145**(2): p. 407-15.

36. Nava, P., et al., *Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways.* Immunity, 2010. **32**(3): p. 392-402.

37. Heller, F., et al., *Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution.* Gastroenterology, 2005. **129**(2): p. 550-64.

38. Nejdfors, P., et al., *Increased colonic permeability in patients with ulcerative colitis: an in vitro study.* Scand J Gastroenterol, 1998. **33**(7): p. 749-53.

39. RM Glickman, J.W., E Braunwald, KJ Isselbacher, RG Petersdorf, JB Martin, AS Fauci, *Inflammatory bowel disease.* Principles of internal medicine, 1991. **Volume 2**: p. pp. 1268–1281.

40. Rachmilewitz, D., et al., *Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease.* Gut, 1995. **36**(5): p. 718-23.

41. Guihot, G., et al., *Inducible nitric oxide synthase activity in colon biopsies from inflammatory areas: correlation with inflammation intensity in patients with ulcerative colitis but not with Crohn's disease.* Amino Acids, 2000. **18**(3): p. 229-37.

42. Fasano, A., et al., *Vibrio cholerae produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(12): p. 5242-6.

43. Schroeder, K.W., W.J. Tremaine, and D.M. Ilstrup, *Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study.* N Engl J Med, 1987. **317**(26): p. 1625-9.

44. Satsangi, J., et al., *The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications.* Gut, 2006. **55**(6): p. 749-53.

45. Caprilli, R., A. Viscido, and G. Latella, *Current management of severe ulcerative colitis.* Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2007. **4**(2): p. 92-101.

46. Gan, S.I. and P.L. Beck, *A new look at toxic megacolon: an update and review of incidence, etiology, pathogenesis, and management.* Am J Gastroenterol, 2003. **98**(11): p. 2363-71.

47. Solberg, I.C., et al., *Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study).* Scand J Gastroenterol, 2009. **44**(4): p. 431-40.

48. Henriksen, M., et al., *Change of diagnosis during the first five years after onset of inflammatory bowel disease: results of a prospective follow-up study (the IBSEN Study).* Scand J Gastroenterol, 2006. **41**(9): p. 1037-43.

49. Rodgers, A.D. and A.G. Cummins, *CRP correlates with clinical score in ulcerative colitis but not in Crohn's disease.* Dig Dis Sci, 2007. **52**(9): p. 2063-8.

50. Roseth, A.G., E. Aadland, and K. Grzyb, *Normalization of faecal calprotectin: a predictor of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease.* Scand J Gastroenterol, 2004. **39**(10): p. 1017-20.

51. Schoepfer, A.M., et al., *Ulcerative colitis: correlation of the Rachmilewitz endoscopic activity index with fecal calprotectin, clinical activity, C-reactive protein, and blood leukocytes.* Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(12): p. 1851-8.

52. Fine, K.D., et al., *Utility of a rapid fecal latex agglutination test detecting the neutrophil protein, lactoferrin, for diagnosing inflammatory causes of chronic diarrhea.* Am J Gastroenterol, 1998. **93**(8): p. 1300-5.

53. D'Inca, R., et al., *Can calprotectin predict relapse risk in inflammatory bowel disease?* Am J Gastroenterol, 2008. **103**(8): p. 2007-14.

54. von Roon, A.C., et al., *Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy.* Am J Gastroenterol, 2007. **102**(4): p. 803-13.

55. Lobaton, T., et al., *The Modified Mayo Endoscopic Score (MMES): A New Index for the Assessment of Extension and Severity of Endoscopic Activity in Ulcerative Colitis Patients.* J Crohns Colitis, 2015. **9**(10): p. 846-52.

56. Mosli, M.H., et al., *Histologic evaluation of ulcerative colitis: a systematic review of disease activity indices.* Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(3): p. 564-75.

57. Hefti, M.M., et al., *Severity of inflammation as a predictor of colectomy in patients with chronic ulcerative colitis.* Dis Colon Rectum, 2009. **52**(2): p. 193-7.

58. Geboes, K., et al., *A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis.* Gut, 2000. **47**(3): p. 404-9.

59. Bressler, B., et al., *Clinical practice guidelines for the medical management of nonhospitalized ulcerative colitis: the Toronto consensus.* Gastroenterology, 2015. **148**(5): p. 1035-1058.e3.

60. Marshall, J.K., et al., *Rectal 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis.* Cochrane Database Syst Rev, 2010(1): p. Cd004115.

61. Feagan, B.G. and J.K. Macdonald, *Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis.* Cochrane Database Syst Rev, 2012. **10**: p. Cd000543.

62. Ford, A.C., et al., *Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis.* Am J Gastroenterol, 2011. **106**(4): p. 590-9; quiz 600.

63. Marshall, J.K. and E.J. Irvine, *Rectal corticosteroids versus alternative treatments in ulcerative colitis: a meta-analysis.* Gut, 1997. **40**(6): p. 775-81.

64. Khan, K.J., et al., *Efficacy of immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis.* Am J Gastroenterol, 2011. **106**(4): p. 630-42.

65. Ford, A.C., et al., *Efficacy of biological therapies in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis.* Am J Gastroenterol, 2011. **106**(4): p. 644-59, quiz 660.

66. Lawson, M.M., A.G. Thomas, and A.K. Akobeng, *Tumour necrosis factor alpha blocking agents for induction of remission in ulcerative colitis.* Cochrane Database Syst Rev, 2006(3): p. Cd005112.

67. Lv, R., et al., *Tumor necrosis factor alpha blocking agents as treatment for ulcerative colitis intolerant or refractory to conventional medical therapy: a meta-analysis.* PLoS One, 2014. **9**(1): p. e86692.

68. Liang, S., et al., *Structural basis for treating tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-associated diseases with the therapeutic antibody infliximab.* J Biol Chem, 2013. **288**(19): p. 13799-807.

69. Truelove, S.C. and L.J. Witts, *Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial.* Br Med J, 1955. **2**(4947): p. 1041-8.

70. Maser, E.A., et al., *Cyclosporine and infliximab as rescue therapy for each other in patients with steroid-refractory ulcerative colitis.* Clin Gastroenterol Hepatol, 2008. **6**(10): p. 1112-6.

71. Oresland, T., et al., *European evidence based consensus on surgery for ulcerative colitis.* J Crohns Colitis, 2015. **9**(1): p. 4-25.

72. Zhao, L.N., et al., *5-Aminosalicylates reduce the risk of colorectal neoplasia in patients with ulcerative colitis: an updated meta-analysis.* PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94208.

73. Lyakhovich, A. and C. Gasche, *Systematic review: molecular chemoprevention of colorectal malignancy by mesalazine.* Aliment Pharmacol Ther, 2010. **31**(2): p. 202-9.

74. Moon, R.T., J.D. Brown, and M. Torres, *WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development.* Trends Genet, 1997. **13**(4): p. 157-62.

75. Morin, P.J., et al., *Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC.* Science, 1997. **275**(5307): p. 1787-90.

76. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity.* N Engl J Med, 2000. **343**(5): p. 338-44.

77. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen Recognition and Innate Immunity.* Cell. **124**(4): p. 783-801.

78. Cua, D.J. and C.M. Tato, *Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 479-489.

79. Takatori, H., et al., *Lymphoid tissue inducer–like cells are an innate source of IL-17 and IL-22.* The Journal of Experimental Medicine, 2009. **206**(1): p. 35-41.

80. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity.* Nat Rev Immunol, 2005. **5**(12): p. 953-64.

81. Grage-Griebenow, E., et al., *Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes.* Eur J Immunol, 2001. **31**(1): p. 48-56.

82. Smythies, L.E., et al., *Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity.* J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 66-75.

83. Cosin-Roger, J., et al., *M2 macrophages activate WNT signaling pathway in epithelial cells: relevance in ulcerative colitis.* PLoS One, 2013. **8**(10): p. e78128.

84. Shepherd, V.L. and J.R. Hoidal, *Clearance of neutrophil-derived myeloperoxidase by the macrophage mannose receptor.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1990. **2**(4): p. 335-40.

85. Lau, S.K., P.G. Chu, and L.M. Weiss, *CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples.* Am J Clin Pathol, 2004. **122**(5): p. 794-801.

86. Bain, C.C., et al., *Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors.* Mucosal Immunol, 2013. **6**(3): p. 498-510.

87. Johansson-Lindbom, B., et al., *Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing.* J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1063-73.

88. Coombes, J.L., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism.* J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1757-64.

89. Mora, J.R., et al., *Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells.* Science, 2006. **314**(5802): p. 1157-60.

90. Melian A, e.a., Curr. Opin. Immunol., 1996(8:82).

91. de Jong, A., et al., *CD1a-autoreactive T cells recognize natural skin oils that function as headless antigens.* Nat Immunol, 2014. **15**(2): p. 177-85.

92. Bourgeois, E.A., et al., *Bee venom processes human skin lipids for presentation by CD1a.* J Exp Med, 2015. **212**(2): p. 149-63.

93. Headland, S.E. and L.V. Norling, *The resolution of inflammation: Principles and challenges.* Seminars in Immunology, 2015. **27**(3): p. 149-160.

94. Zenewicz, L.A., A. Antov, and R.A. Flavell, *CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease.* Trends Mol Med, 2009. **15**(5): p. 199-207.

95. Di Sabatino, A., et al., *New pathogenic paradigms in inflammatory bowel disease.* Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(2): p. 368-71.

96. Rovedatti, L., et al., *Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease.* Gut, 2009. **58**(12): p. 1629-36.

97. Vainer, B., et al., *Colonic expression and synthesis of interleukin 13 and interleukin 15 in inflammatory bowel disease.* Cytokine, 2000. **12**(10): p. 1531-6.

98. Kaplan, M.H., et al., *Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice.* Nature, 1996. **382**(6587): p. 174-7.

99. Amsen, D., A. Antov, and R.A. Flavell, *The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(2): p. 116-24.

100. Di Sabatino, A., et al., *Functional modulation of Crohn's disease myofibroblasts by anti-tumor necrosis factor antibodies.* Gastroenterology, 2007. **133**(1): p. 137-49.

101. Biancheri, P., et al., *Proteases and the gut barrier.* Cell and Tissue Research, 2012. **351**(2): p. 269-280.

102. Ogino, T., et al., *Increased Th17-inducing activity of CD14+ CD163 low myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease.* Gastroenterology, 2013. **145**(6): p. 1380-91.e1.

103. Junttila, I.S., et al., *Tuning sensitivity to IL-4 and IL-13: differential expression of IL-4Ralpha, IL-13Ralpha1, and gammac regulates relative cytokine sensitivity.* J Exp Med, 2008. **205**(11): p. 2595-608.

104. Nelms, K., et al., *The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions.* Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 701-38.

105. Fichtner-Feigl, S., et al., *Induction of IL-13 triggers TGF-beta1-dependent tissue fibrosis in chronic 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis.* J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5859-70.

106. Shahabuddin, S., P. Ponath, and R.P. Schleimer, *Migration of eosinophils across endothelial cell monolayers: interactions among IL-5, endothelial-activating cytokines, and C-C chemokines.* J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3847-54.

107. Burmeister Getz, E., D.M. Fisher, and R. Fuller, *Human pharmacokinetics/pharmacodynamics of an interleukin-4 and interleukin-13 dual antagonist in asthma.* J Clin Pharmacol, 2009. **49**(9): p. 1025-36.

108. Wenzel, S., et al., *Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in asthmatic patients: results of two phase 2a studies.* Lancet, 2007. **370**(9596): p. 1422-31.

109. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells.* Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-89.

110. Andoh, A., et al., *Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts.* Gastroenterology, 2005. **129**(3): p. 969-84.

111. Seiderer, J., et al., *Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD.* Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(4): p. 437-45.

112. Ziegler, S.F. and J.H. Buckner, *FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation.* Microbes Infect, 2009. **11**(5): p. 594-8.

113. Tsuji, N.M. and A. Kosaka, *Oral tolerance: intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells.* Trends Immunol, 2008. **29**(11): p. 532-40.

114. Zhou, L., et al., *TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function.* Nature, 2008. **453**(7192): p. 236-40.

115. Li, M.O., S. Sanjabi, and R.A. Flavell, *Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms.* Immunity, 2006. **25**(3): p. 455-71.

116. Christophi, G.P., et al., *Immune markers and differential signaling networks in ulcerative colitis and Crohn's disease.* Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(12): p. 2342-56.

117. M. Föhlinger, P.P., U. Mansmann, F. Beigel, M. Siebeck, R. Gropp, *Immunological profiling of UC patients leads to identification of two inflammatory conditions and CD1a as a marker for UC.* 2016.

118. Molnarfi, N., et al., *Hepatocyte growth factor: A regulator of inflammation and autoimmunity.* Autoimmun Rev, 2015. **14**(4): p. 293-303.

119. Jiang, Q., et al., *Differential responsiveness of cord and adult blood monocytes to hepatocyte growth factor.* Clin Exp Immunol, 2001. **125**(2): p. 222-8.

120. Moransard, M., et al., *Expression of the HGF receptor c-met by macrophages in experimental autoimmune encephalomyelitis.* Glia, 2010. **58**(5): p. 559-71.

121. Yamada, Y., S. Saito, and H. Morikawa, *Hepatocyte growth factor in human breast milk.* Am J Reprod Immunol, 1998. **40**(2): p. 112-20.

122. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment.* F1000Prime Rep, 2014. **6**.

123. Nathan, C. and A. Ding, *Nonresolving inflammation.* Cell, 2010. **140**(6): p. 871-82.

124. Serhan, C.N., N. Chiang, and T.E. Van Dyke, *Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 349-61.

125. Rossol, M., et al., *LPS-induced Cytokine Production in Human Monocytes and Macrophages.* 2011. **31**(5): p. 379-446.

126. Ohkusa, T., *[Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora]*. Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi, 1985. **82**(5): p. 1327-36.

127. Madara, J.L., et al., *Characterization of spontaneous colitis in cotton-top tamarins (Saguinus oedipus) and its response to sulfasalazine.* Gastroenterology, 1985. **88**(1 Pt 1): p. 13-9.

128. Waterston, R.H., et al., *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome*. Nature, 2002. **420**(6915): p. 520-62.

129. Mizoguchi, A., *Animal models of inflammatory bowel disease.* Prog Mol Biol Transl Sci, 2012. **105**: p. 263-320.

130. Dieleman, L.A., et al., *Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines.* Clin Exp Immunol, 1998. **114**(3): p. 385-91.

131. Jiminez, J.A., et al., *Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals.* Gut Pathog, 2015. **7**: p. 29.

132. Yan, Y., et al., *Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis.* PLoS One, 2009. **4**(6): p. e6073.

133. Schnabel, F.P., *Charakterisierung des Modells der Dextransulfat induzierten Colitis der BALB/c-Maus, Dissertation aus der medizinischen Fakultät*. 2010, LMU München.

134. Elson, C.O., et al., *Experimental models of inflammatory bowel disease.* Gastroenterology, 1995. **109**(4): p. 1344-67.

135. Kawada, M., A. Arihiro, and E. Mizoguchi, *Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease.* World J Gastroenterol, 2007. **13**(42): p. 5581-93.

136. Boirivant, M., et al., *Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4.* J Exp Med, 1998. **188**(10): p. 1929-39.

137. Lakhan, S.E. and A. Kirchgessner, *Neuroinflammation in inflammatory bowel disease.* J Neuroinflammation, 2010. **7**: p. 37.

138. Nolte, T., et al., *Oxazolone and ethanol induce colitis in non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2Rgamma(null) mice engrafted with human peripheral blood mononuclear cells.* Clin Exp Immunol, 2013. **172**(2): p. 349-62.

139. Sugamura, K., et al., *The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID.* Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 179-205.

140. Shultz, L.D., et al., *Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells.* J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6477-89.

141. Couzin-Frankel, J., *When mice mislead.* Science, 2013. **342**(6161): p. 922-3, 925.

142. Arrowsmith, J., *Trial watch: Phase II failures: 2008-2010.* Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(5): p. 328-9.

143. Suntharalingam, G., et al., *Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412.* N Engl J Med, 2006. **355**(10): p. 1018-28.

144. Mestas, J. and C.C. Hughes, *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology.* J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2731-8.

145. Weigmann, B., et al., *Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue.* Nat Protoc, 2007. **2**(10): p. 2307-11.

146. Uronen-Hansson, H., Persson, E., Nilsson, P. and Agace, W. , *Isolation of Cells from Human Intestinal Tissue.* Bio-protocol 4(7): e1092, 2014.

147. Walmsley, R.S., et al., *A simple clinical colitis activity index.* Gut, 1998. **43**(1): p. 29-32.

148. Erben, U., et al., *A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models.* Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(8): p. 4557-76.

149. R. M. Hesselton, R.A.K., M. A. Cromwell, B. S. Graham, M. Johns and J. L. Sullivan, *Human Peripheral Blood Xenografts in the SCID Mouse: Characterization of Immunologic Reconstitution* The Journal of Infectious Diseases, 1993. **Vol. 168**: p. 630-640

150. Ali, N., et al., *Xenogeneic graft-versus-host-disease in NOD-scid IL-2Rgammanull mice display a T-effector memory phenotype.* PLoS One, 2012. **7**(8): p. e44219.

151. Pearson, T., D.L. Greiner, and L.D. Shultz, *Creation of "Humanized" Mice to Study Human Immunity.* Curr Protoc Immunol, 2008. **Chapter**: p. Unit-15.21.

152. Hoffmann, J.J., *Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis.* Clin Chem Lab Med, 2009. **47**(8): p. 903-16.

153. Zhu, Y., et al., *The pentacyclic triterpene Lupeol switches M1 macrophages to M2 and ameliorates experimental inflammatory bowel disease.* Int Immunopharmacol, 2016. **30**: p. 74-84.

154. Jiang, X., et al., *Tim-3 promotes intestinal homeostasis in DSS colitis by inhibiting M1 polarization of macrophages.* Clin Immunol, 2015. **160**(2): p. 328-35.

155. Lissner, D., et al., *Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD.* Inflamm Bowel Dis, 2015. **21**(6): p. 1297-305.

156. Minar, P., et al., *Utility of neutrophil Fcgamma receptor I (CD64) index as a biomarker for mucosal inflammation in pediatric Crohn's disease.* Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(6): p. 1037-48.

157. Franze, E., et al., *Lesional accumulation of CD163-expressing cells in the gut of patients with inflammatory bowel disease.* PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69839.

158. Dige, A., et al., *Soluble CD163, a specific macrophage activation marker, is decreased by anti-TNF-alpha antibody treatment in active inflammatory bowel disease.* Scand J Immunol, 2014. **80**(6): p. 417-23.

159. Kawashima, T., et al., *Cutting edge: major CD8 T cell response to live bacillus Calmette-Guerin is mediated by CD1 molecules.* J Immunol, 2003. **170**(11): p. 5345-8.

160. Ali Y, D.M., Fendler EJ, Larson EL, *Alcohols. Disinfection, sterilization and preservation*. Lippincott Williams & Wilkins. 2001. 229-254.

161. Schuurhuis, D.H., et al., *Antigen-antibody immune complexes empower dendritic cells to efficiently prime specific CD8+ CTL responses in vivo.* J Immunol, 2002. **168**(5): p. 2240-6.

162. Tanaka, M., et al., *Activation of Fc gamma RI on monocytes triggers differentiation into immature dendritic cells that induce autoreactive T cell responses.* J Immunol, 2009. **183**(4): p. 2349-55.

163. Bahari, A., et al., *Target antigens for perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in Iranian patients with ulcerative colitis.* Middle East J Dig Dis, 2014. **6**(4): p. 203-7.

164. Dabritz, J., et al., *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor auto-antibodies and disease relapse in inflammatory bowel disease.* Am J Gastroenterol, 2013. **108**(12): p. 1901-10.

165. Ardesjo, B., et al., *Immunoreactivity against Goblet cells in patients with inflammatory bowel disease.* Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(5): p. 652-61.

166. Irani, Y., et al., *Species Cross-Reactivity of Antibodies Used to Treat Ophthalmic Conditions.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016. **57**(2): p. 586-91.

167. Bedini, C., et al., *Antitumour necrosis factor-alpha chimeric antibody (infliximab) inhibits activation of skin-homing CD4+ and CD8+ T lymphocytes and impairs dendritic cell function.* Br J Dermatol, 2007. **157**(2): p. 249-58.

168. Vos, A.C., et al., *Anti-tumor necrosis factor-alpha antibodies induce regulatory macrophages in an Fc region-dependent manner.* Gastroenterology, 2011. **140**(1): p. 221-30.

169. Vos, A.C., et al., *Regulatory macrophages induced by infliximab are involved in healing in vivo and in vitro.* Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(3): p. 401-8.

170. P. Palamides, M.F., H. Jodeleit, F. Beigel, N. Herbach, T. Mueller, E. Wolf, M. Siebeck, R. Gropp, *Characterization and validation of ethanol induced mouse model for Colitis ulcerosa using NOD-SCID IL2rγnull mice reconstituted with PBMC from human patients with ulcerative colitis.* 2016.

171. Sidhu, S.S., et al., *Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF-beta activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(32): p. 14170-5.

172. Reinisch, W., et al., *Anrukinzumab, an anti-interleukin 13 monoclonal antibody, in active UC: efficacy and safety from a phase IIa randomised multicentre study.* Gut, 2015. **64**(6): p. 894-900.

173. Heller, F., et al., *Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells.* Immunity, 2002. **17**(5): p. 629-38.

174. Kell, D.B. and E. Pretorius, *On the translocation of bacteria and their lipopolysaccharides between blood and peripheral locations in chronic, inflammatory diseases: the central roles of LPS and LPS-induced cell death.* Integr Biol (Camb), 2015. **7**(11): p. 1339-77.

175. King, M.A., et al., *Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex.* Clin Exp Immunol, 2009. **157**(1): p. 104-18.

12 ANHANG

12.1 Abbildungen zur Gatingstrategie

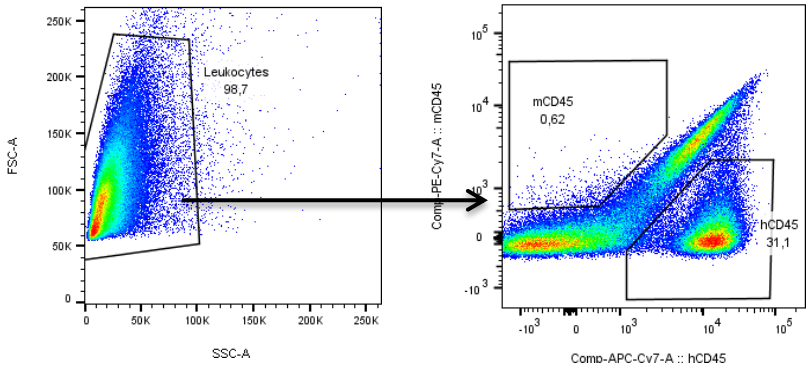


Abbildung 36: Gatingstrategie zur Auswertung humaner und muriner CD45$^+$ Zellen.

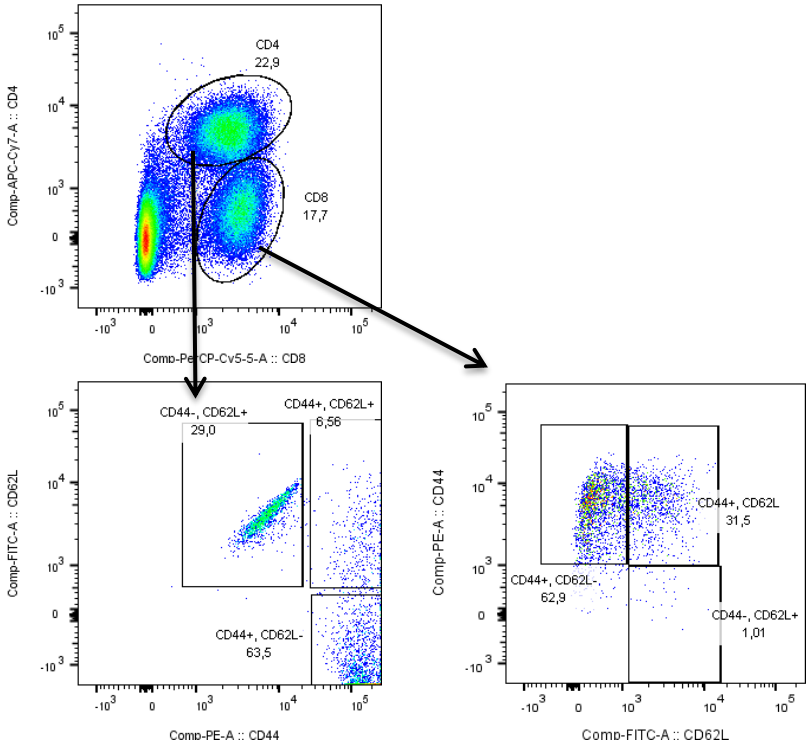


Abbildung 37: Gatingstrategie zur Auswertung humaner CD4$^+$ Zellen. Bestimmt wurden auch die CD4$^+$CD44$^+$CD62L$^+$ und CD4$^+$CD44$^-$CD62L$^+$ Zellen.

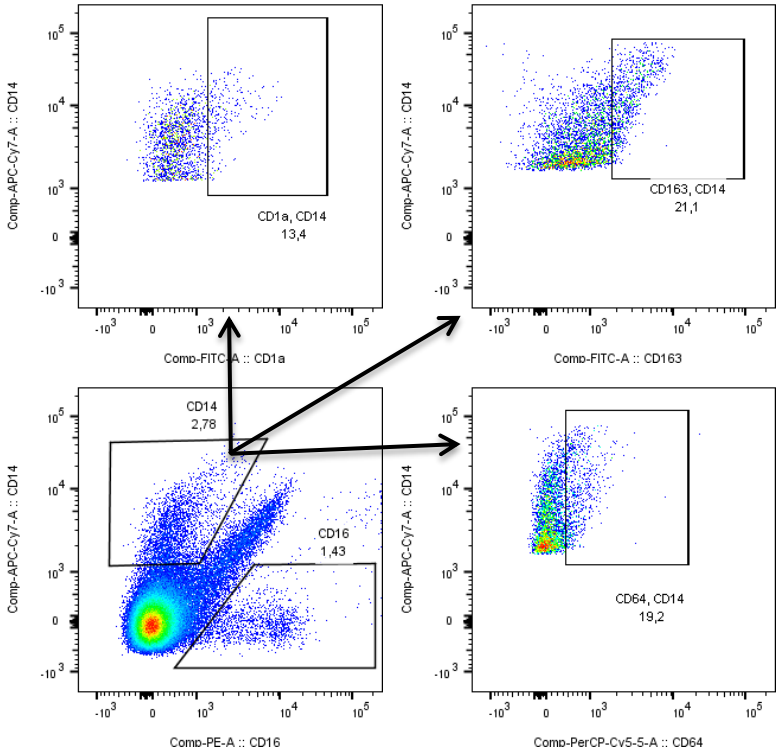


Abbildung 38: Gatingstrategie zur Auswertung humaner CD14$^+$ Zellen. Bestimmt wurden auch die CD14$^+$CD64$^+$, CD14$^+$CD1a$^+$ und CD14$^+$CD163$^+$ Zellen.

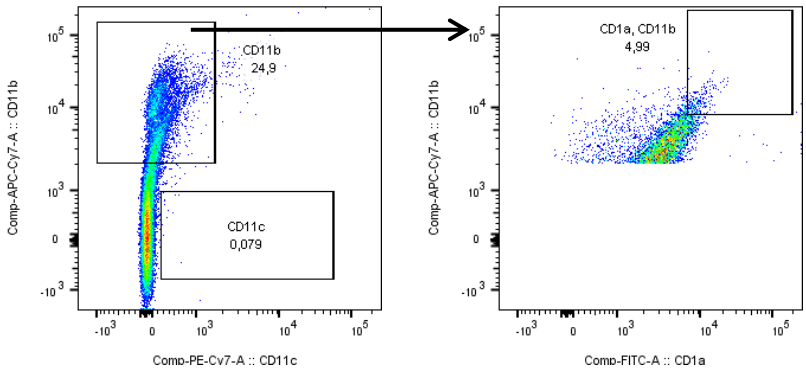


Abbildung 39: Gatingstrategie zur Auswertung humaner CD11b$^+$ - und CD1a$^+$ Zellen.

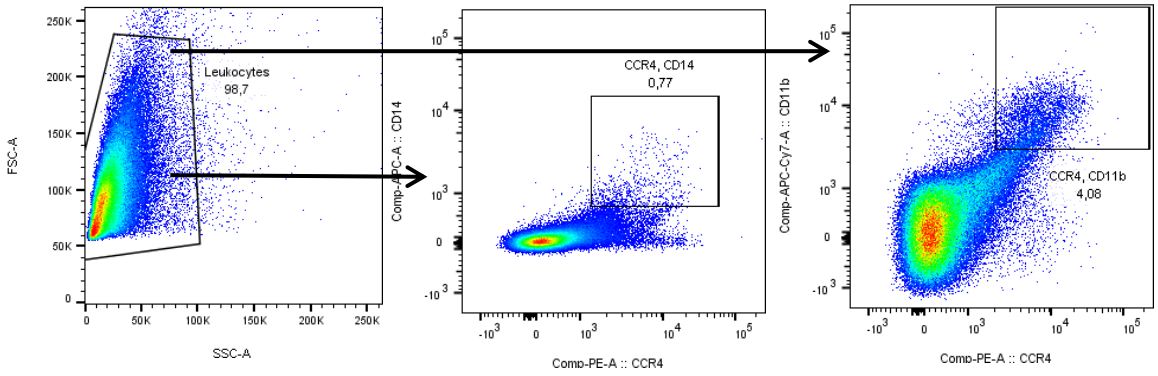


Abbildung 40: Gatingstrategie zur Auswertung humaner CCR4$^+$ Zellen.

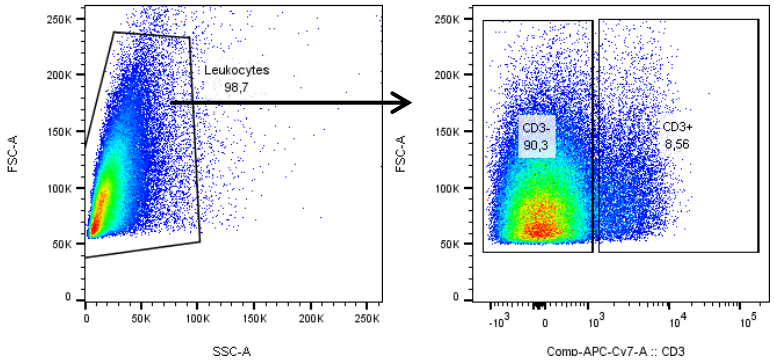


Abbildung 41: Gatingstrategie zur Auswertung humaner CD3$^+$ Zellen.

12.2 Tabellen zur statistischen Auswertung

Tabelle 9: Statistische Werte für die Analyse der peripheren mononukleären Zellen aus dem Blut des Menschen. Es wurde mit einem Konfidenzintervall von 95% gearbeitet.

	PBMC						
	Gesund			*UC*			
	Mean	*SD*	*N*	*Mean*	*SD*	*N*	*P*
CD4+	32,72	12,62	30	23,89	12,3	42	0,004
CD4+CD44+CD62L+	57,44	19,57	30	29,22	21,95	42	< 0,0001
CD8+	16,54	7,77	30	16,01	10,12	42	
CD8+CD44+CD62L+	36,60	20,06	30	19,20	15,46	42	
CD14+	6	4,18	30	6,12	6,32	42	
CD14+CD1a+	59,3	22,41	9	79,78	24,1	28	0,03
CD14+CD64+	7,61	5,32	10	0,37	0,49	25	0,003
CD14+CD163+	6,08	4,8	10	2,96	2,85	28	
CD11b+CD1a+	5,07	17,97	31	23,06	23,02	42	0,0003

Tabelle 10: Statistische Werte für die Analyse der Lamina Propria Zellen aus dem Kolon des Menschen. Es wurde mit einem Konfidenzintervall von 95% gearbeitet.

	LPMC						
	Nicht-UC			*UC*			
	Mean	*SD*	*N*	*Mean*	*SD*	*N*	*P*
CD4+	2,93	1,51	5	6,77	7,82	2	
CD4+CD44+CD62L+	35,31	40,9	5	25,25	21,28	2	
CD8+	4,19	2,79	5	7,63	9,43	2	
CD8+CD44+CD62L+	22,38	17,40	5	47,25	0,07	2	
CD14+	1,5	0,64	5	5,29	0,42	2	0,002
CD14+CD1a+	48,94	16,96	5	72,55	1,76	2	0,03
CD14+CD64+	12,63	5,98	5	26,85	4,17	2	0,04
CD14+CD163+	13,66	3,26	5	21,7	5,37	2	
CD11b+CD1a+	18,37	7,24	4	51,95	14,21	2	

Tabelle 11: Statistische Werte für die Versuche mit den Spendern 47, 58, 59, 65 und 70. Es wurde mit einem Konfidenzintervall von 95% gearbeitet.

	Versuche mit den 47, 58, 59, 65, 70						
	Kontrollgruppe			*Ethanol + NaCl*			
	Mean	*SD*	*N*	*Mean*	*SD*	*N*	*P*
Klinischer Aktivitätsscore	1	1,12	20	7,85	8,59	20	0,002
Histologischer Score	1,15	1,01	19	5,8	2,26	20	<0,0001
Makroskopischer Score	1,17	1,84	17	3,52	2,34	19	0,001
hCD45	8,79	9,38	20	15,04	12,76	20	0,08
CD4+	2,66	3,45	20	5,57	7,83	18	
CD4+CD44+CD62L+	2,64	2,14	19	6,82	7,19	18	0,02
CD8+	1,08	1,95	20	1,7	4,12	18	
CD8+ CD44+ CD62L+	6,25	8,2	14	4,02	9,03	13	
CD14+	3,03	4,38	19	6,48	7,24	20	
CD14+CD1a+	7,33	5,27	19	24,28	23,37	20	0,004
CD14+CD64+	3,48	3,47	20	16,91	12,71	20	0,0001
CD14+CD163+	7,66	6,77	20	25,16	19,7	20	0,001
CD11b+CD1a+	6,28	3,31	20	12,62	6,4	20	0,0004

Tabelle 12: Statistische Werte für die Versuche mit den Spendern 65 und 70. P bezieht sich auf den Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen K=Kontrolle, N=Ethanol+NaCl und I=Ethanol+Infliximab. Es wurde mit einem Konfidenzintervall von 95% gearbeitet.

Versuche mit den Spendern 65, 70

	Kontrollgruppe			*Ethanol + NaCl*			*Ethanol + Inflixmab*			
	Mean	*SD*	*N*	*Mean*	*SD*	*N*	*Mean*	*SD*	*N*	*P*
Klinischer Aktivitätsscore	1,25	1,16	8	12,35	11,56	8	5,75	5	8	KN p= 0,01
Histologischer Score	0,87	0,83	8	7	2,5	8	4,14	1,06	7	KN p=<0,001; KI p= 0,003; NI p=0,009
Makroskopischer Score	0,4	0,89	5	4,12	3,39	8	2,71	1,38	7	KN p=0,03
hCD45	3,62	2,84	8	16,3	14,5	8	7,09	9,82	8	KN p= 0,055
CD4+	1,63	1,96	8	8,2	9,29	6	3,21	6,84	8	
CD4+CD44+CD62L+	3,06	2,53	8	15,47	4,38	6	1,71	2,97	8	KN p=<0,0001. NI p=<0,0001
CD8+	0,57	0,93	8	3,1	1,37	6	0,56	1,37	8	
CD8+ CD44-CD62L+	25,54	47,27	4	42,92	59,22	2	49,94	40,9	4	
CD14+	1,52	0,74	7	4,77	4,91	8	1,83	0,84	8	
CD14+CD1a+	10,79	7	7	39,33	31,25	8	12,12	3,73	8	KN p=0,02; NI p=0,02
CD14+CD64+	6,45	2,33	8	23,51	5,32	8	16,35	3,38	8	KN p=<0,001; KI p=<0,001; NI p=0,02
CD14+CD163+	10,77	8,99	8	27,78	23,06	8	9,69	7,34	8	NI p=0,06
CD14+CCR4+	2,42	2,33	8	11,01	8,17	8	6,8	6,85	8	KN p=0,03

Tabelle 13: Statistische Werte für die Versuche mit den Spendern 47, 58, 59.
P bezieht sich auf den Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen K=Kontrolle, N=Ethanol+NaCl und P=Ethanol+Pitrakinra. Es wurde mit einem Konfidenzintervall von 95% gearbeitet.

Versuche mit den Spendern 47, 58, 59

	Kontrollgruppe			*Ethanol + NaCl*			*Ethanol + Pitrakinra*			
	Mean	*SD*	*N*	*Mean*	*SD*	*N*	*Mean*	*SD*	*N*	*P*
CD4+	3,35	4,1	12	4,25	7,06	12	11,27	13,58	11	
CD4+CD44+CD62L+	2,34	1,89	11	2,49	3,18	12	10,93	9,56	11	KP p=0,004; NP p=0,004
CD8+	1,42	2,38	12	1	2,12	12	4,09	3,59	11	NP p=0,02
CD8+CD44+CD62L+	3,99	5,32	11	1,22	2,11	12	13,02	13,06	11	KP p=0,03; NP p=0,004
CD3+	9,67	4,81	12	9,84	7,75	12	24,08	14,98	11	KP p=0.00412; NP p=0.00456
CD14+CCR4+	1,13	0,52	4	1,96	0,76	4	3,51	0,99	4	KP p=0,005; NP p=0,04
CD11b+CCR4+	4,62	2,19	4	5,67	2,8	4	13,95	2,58	4	KP p=0,001; NP p=0,003
CD11b+CD1a+	5,91	2,78	12	10,91	4,8	12	12,99	2,71	11	KN p=0,04; KP p=<0,0001

12.3 Antikörper zur FACS-Analyse im Detail

Tabelle 14: Antikörper zur FACS-Analyse im Detail.

Marker	Klon	Farbe	Funktion	Expression	Isotyp-
CD45	2D1	APC Cy7	Antigenvermittelte B- und T-Zell Aktivierung	Leukozyten	IgG1
mCD45	30-F11	PE Cy7	Antigenvermittelte B- und T-Zell Aktivierung	Leukozyten	IgG2b
CD62L	DREG-56	FITC	Leukocyte homing, leukocyte tethering, rolling	T, B, NK, Ma, Gr	IgG1
CD44	BJ18	PE	Ausbildung von B- und T-Memoryzellen	T, B, NK, Ma, Gr	IgG1
CD8	SK1	PerCP Cy5.5	MHC I – Korezeptor, Antigenerkennung und T-Zell Aktivierung	T, NK	IgG1
CD294 (CRTH2)	BM16	APC	Chemotaxis von Eosinophilen, Basophilen und Th2 Zellen	T, Gr	IgG2a
CD4	OKT4	APC Cy 7	T-Zellen Aktivierung	T, Ma, Gr	IgG2b
CCR4 (CD194)	L291H4	PE	Bindung von CCL17, CCL22	T, B, Gr, Mo, NK	IgG1
CD14	HCD14	APC Cy 7	Vermittelt angeborene Immunität gegen bakterielles LPS	Mo, Ma, Gr	IgG1
CD1a	HI149	Biotin / FITC	Lipidantigenpräsentation	Ma, Mo, DC	IgG1
CD163	GHI/61	FITC	Regulierung der Zytokinproduktion in Makrophagen	Ma	IgG1(FC)
CD64	10.1	PerCP Cy5.5	Vermittlung von Phagozytose von IgG/Antigen-Komplexen	Mo, Ma, DC, Gr	IgG1
CD206	15-2	APC	Endo- und Phagozytose, Makrophagenaktivierung	Ma, DC	IgG1
CD11b	ICRF44	APC Cy 7	Zelladhäsion und Chemotaxis	T, B, NK, Ma, Gr	IgG2b
CD3	HIT3a	APC Cy 7	Teil des T-Zell Rezeptors, Signal Transduktion, T-Zell Aktivierung	T	IgG2a

12.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verlaufsformen von UC 5

Abbildung 2: Übersicht über die medikamentöse Behandlung eines akuten Schubes UC. 7

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Vorgänge im steady state. 9

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Monozyten- und Makrophagendifferenzierung. 12

Abbildung 5: Schematische Darstellung der T-Zelldifferenzierung. 14

Abbildung 6: Darstellung der IL-4/ 13 Kaskade.. 15

Abbildung 7: Schematische Darstellung der immunologischen Vorgänge und der pathologischen Manifestation einer UC. 18

Abbildung 8: Schema zur Auslösung einer Kolitis mit Ethanol. 29

Abbildung 9: Detailaufnahmen zum histologischen Score. 38

Abbildung 10: Box and Whisker Plot zum Vergleich der Spender mit der gesamten UC Population..... 43

Abbildung 11: Box and Whisker Plot zur Darstellung des klinischen Aktivitätsscore des histologischen Scores und des makroskopischen Scores nach Auslösung einer Kolitis..... 44

Abbildung 12: Darstellung des klinischen Aktivitätsscore und des Körpergewichts im Versuchsverlauf. 44

Abbildung 13: Vergleich des makroskopischen Bildes in Kontrollgruppe und der Ethanol + NaCl Gruppe 45

Abbildung 14: Vergleich des histologischen Bildes in Kontrollgruppe und der Ethanol + NaCl Gruppe 46

Abbildung 15: ROC Kurvenanalyse zur Bestimmung der Cut-off Werte für die Unterscheidung zwischen kranken und gesunden Tieren im Tiermodell. 47

Abbildung 16: Box and Whisker Plot zur Darstellung des Anteils $CD45^+$ Zellen 48

Abbildung 17: Box and Whisker Plot zu Darstellung des Anteils $CD4^+$ Zellen und der $CD4^+CD44^+CD62L^+$ Zellen 49

Abbildung 18: Box and Whisker Plot zu Darstellung des Anteils $CD8^+$ Zellen und der $CD8^+CD44^+CD62L^+$ Zellen 50

Abbildung 19: Box and Whisker Plot zur Darstellung des Anteils $CD14^+$ Zellen 51

Abbildung 20: Box and Whisker Plot zur Darstellung des Anteils $CD64^+CD14^+$ Zellen 52

Abbildung 21: Box and Whisker Plot zur Darstellung des Anteils $CD163^+CD14^+$ Zellen 52

Abbildung 22: Box and Whisker Plot zur Darstellung des Anteils $CD1a^+CD14^+$ Zellen 53

Abbildung 23: Box and Whisker Plot zur Darstellung des Anteils $CD1a^+CD11b^+$ Zellen 54

Abbildung 24: Verteilung humaner mononukleärer Zellen im Kolon der Maus. 54

Abbildung 25: Box and Whisker Plot zur Entwicklung des klinischen Aktivitätsscores, des histologischen Scores und des makroskopischen Scores nach Gabe von Infliximab. 55

Abbildung 26: Vergleich des makroskopischen Bildes in Kontrollgruppe, Ethanol + NaCl Gruppe und Ethanol + Infliximab Gruppe. 55

Abbildung 27: Vergleich des histologischen Bildes in Kontrollgruppe, Ethanol + NaCl Gruppe und Ethanol + Infliximab Gruppe.. 56

Abbildung 28: Box and Whisker Plot zur Entwicklung der $CD4^+$ Zellen, $CD4^+CD44^+CD62L^+$ und $CD8^+CD44^-CD62L^+$ in der Milz der Maus.. 57

Abbildung 29: Box and Whisker Plot zur Entwicklung der $CD14^+$ Zellen und der anteiligen Subpopulationen.. 58

Abbildung 30: Vergleich des makroskopischen Bildes in Kontrollgruppe und Ethanol + Pitrakinra Gruppe. 59

Abbildung 31: Vergleich des histologischen Bildes in Kontrollgruppe und Ethanol + Pitrakinra Gruppe.. 60

Abbildung 32: Box and Whisker Plots zu Darstellung der Wirkung von Pitrakinra 61

Abbildung 33: Hypothese zu den Vorgängen durch die Kolitisauslösung. 69

Abbildung 34: Schematische Darstellung der Wirkung von Infliximab in diesem Modell. 72

Abbildung 35: Schematische Darstellung der Wirkung von Pitrakinra in diesem Modell. 73

Abbildung 36: Gatingstrategie zur Auswertung humaner und muriner $CD45^+$ Zellen. 92

Abbildung 37: Gatingstrategie zur Auswertung humaner $CD4^+$ Zellen. 92

Abbildung 38: Gatingstrategie zur Auswertung humaner $CD14^+$ Zellen. 93

Abbildung 39: Gatingstrategie zur Auswertung humaner $CD11b^+$ - und $CD1a^+$ Zellen. 93

Abbildung 40: Gatingstrategie zur Auswertung humaner $CCR4^+$ Zellen. 94

Abbildung 41: Gatingstrategie zur Auswertung humaner $CD3^+$ Zellen. 94

12.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Tiermodelle zur experimentell ausgelösten Kolitis und der beteiligten nachgewiesenen immunologischen Vorgänge. 20

Tabelle 2: Anzahl der verwendeten Tiere in der jeweiligen Gruppe. 30

Tabelle 3: Kriterien und deren Bewertung zur Beurteilung der klinischen Aktivität in der Maus. 31

Tabelle 4: Kriterien und deren Bewertung zur Erstellung eines makroskopischen Score. 32

Tabelle 5: Antikörper zur FACS-Analyse 35

Tabelle 6: Kriterien und deren Bewertung zur Erstellung eines histologischen Score. 37

Tabelle 7: Übersicht über die Krankheitsaktivität der Spender mit UC. 42

Tabelle 8: Korrelationsanalyse zwischen den beteiligten Zellen und der Entwicklung des klinischen Aktivitätsscores und des histologischen Scores. 62

Tabelle 9: Statistische Werte für die Analyse der peripheren mononukleären Zellen aus dem Blut des Menschen.. 95

Tabelle 10: Statistische Werte für die Analyse der Lamina Propria Zellen aus dem Kolon des Menschen.. 95

Tabelle 11: Statistische Werte für die Versuche mit den Spendern 47, 58, 59, 65 und 70.. 96

Tabelle 12: Statistische Werte für die Versuche mit den Spendern 65 und 70 97

Tabelle 13: Statistische Werte für die Versuche mit den Spendern 47, 58, 59. 98

Tabelle 14: Antikörper zur FACS-Analyse im Detail 99

13 EIDESTATTLICHE ERKLÄRUNG

Pia Fiona Palamides

Zenettistr. 29

80337 München

Ehrenwörtliche Erklärung zu meiner Dissertation
mit dem Titel:
„Charakterisierung eines neuen Colitis ulcerosa Modells in NOD Scid IL2Rγ Chain^{null}
Mäusen mit humanisiertem Immunsystem“

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

München, den 21.03.2016 Pia Palamides

14 DANKSAGUNG

Ich möchte an erster Stelle meinen Betreuern Frau Dr. Roswitha Gropp, Herr Prof. Dr. Matthias Siebeck und Herr Prof. Dr. Eckhard Wolf für die Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Kollegen, Michael, Henrika, Janina und Omar für ihre Unterstützung in allen Belangen meiner praktischen Arbeit bedanken.

Mein alltäglicher Dank galt, und gilt, dem gesamten Team der Zentralen Versuchstierhaltung, die das Leben durch ihre Arbeit so viel einfacher machten.

Ich möchte mich auch bei meinen besten Freundinnen, Lisa, Eva, Katharina und Steffanie bedanken. Sie begleiten mich seit dem ersten Tag des Studiums und waren meine größte Stütze. Besonders Katharina, mit der ich in den letzten Monaten sämtliche wissenschaftliche Fragestellungen diskutierten konnte und deren eigenes Vorankommen meine größte Motivation war.

Ganz besonders möchte ich mich bei Chris bedanken, der mich bedingungslos unterstützte, mir Rückhalt gab, eine Lösung für viele Probleme wusste und zu jeder Uhrzeit ein offenes Ohr für mich hatte.

Nicht zu vergessen Aldo, Eva und Nina für die kritische Durchsicht meiner Arbeit.