

Autoimmunität als wesentlicher Bestandteil des
Entzündungsprozesses bei *Colitis ulcerosa*

von Henrika Katharina Jodeleit

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

Autoimmunität als wesentlicher Bestandteil des
Entzündungsprozesses bei *Colitis ulcerosa*

von Henrika Katharina Jodeleit

aus München

München 2017

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 Allgemeine-, Viszeral-,
Transplantations- und Gefäßchirurgie

Mentor: Prof. Dr. Matthias Siebeck

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferent/en: Prof. Dr. Clemens Knospe

Tag der Promotion: 29. Juli 2017

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1.	<i>Colitis ulcerosa</i>	2
2.1.1.	Definition und Bedeutung	2
2.1.2.	Epidemiologie	2
2.1.3.	Ätiologie.....	3
2.1.4.	Pathogenese.....	5
2.2.	Klinik	7
2.2.1.	Klassifizierung	7
2.2.2.	Klinischer Verlauf.....	8
2.2.3.	Diagnose.....	8
2.2.4.	Therapie.....	10
2.2.5.	Komplikationen und Spätfolgen.....	11
2.3.	Immunologische Vorgänge	11
2.3.1.	Angeborene Immunantwort.....	11
2.3.2.	Adaptive Immunantwort	14
2.3.3.	Zytokine und Chemokine	18
2.3.4.	Autoimmunität	20
2.4.	Tiermodelle	21
2.5.	NOD-scid IL2Rγ-chain^{null}-Mäuse	22
3	Fragestellung und Ziele	24
3.1.	Fragestellung	24
3.2.	Ziele	25
4	Material und Methoden	27
4.1.	Spenderrekrutierung	27
4.2.	Versuchstiere	27
4.3.	Isolierung humaner PBMC	27
4.4.	Rekonstitution	28
4.5.	Versuchsablauf	28
4.5.1.	Tierzahlen und Versuchsgruppen.....	28
4.5.2.	Behandlungsprotokoll	29
4.5.3.	Ethanol-, Antigen- und Medikamentenapplikation	30
4.5.4.	Klinischer Aktivitätsscore	31
4.5.5.	Makroskopische Bewertung des Kolons	32
4.6.	Analysen	32
4.6.1.	Versuchsende	32
4.6.2.	FACS-Analyse	33
4.6.3.	Histologie	34
4.6.4.	PCR	36
4.6.5.	Zellkultur.....	37
4.6.6.	Immunprofilierung	38
4.6.7.	Statistik.....	38
5	Ergebnisse	39

5.1. Immunprofilierung	39
5.2. Auswertung der Spender	39
5.3. Untersuchung der <i>in vitro</i>-Effekt der Antigene Pr3 und CD99	41
5.4. Charakterisierung der immunologischen Vorgänge im Mausmodell	44
5.5. Antigen-Effekte im Mausmodell.....	45
5.5.1. Auswirkungen von Pr3 und CD99 auf die klinische Aktivität.....	45
5.5.2. Auswirkungen von Pr3 und CD99 auf die Histologie.....	46
5.5.3. Auswirkungen von Pr3 und CD99 auf das immunologische Bild	47
5.5.4. Auswirkungen auf die Zellpopulationen im Kolon der Maus	49
5.6. Effekt eines mTOR-Inhibitors im Mausmodell.....	51
5.6.1. Auswirkungen von Sirolimus auf die klinische Aktivität	51
5.6.2. Auswirkungen von Sirolimus auf die Histologie	53
5.6.3. Auswirkungen von Sirolimus auf das immunologische Bild.....	53
5.6.4. Auswirkungen von Sirolimus auf die Zellpopulationen im Kolon der Maus.....	57
5.6.5. Auswirkungen von Sirolimus auf das Zytokinprofil	59
6 Diskussion	62
6.1. Ziel I: Identifizierung möglicher krankheitsrelevanter Autoantigene in Kolitis-Patienten	62
6.1.1. Hypothese 1: Autoimmunität beeinflusst den Entzündungsprozess bei <i>Colitis ulcerosa</i>	62
6.2. Ziel II: Verständnis der immunologischen Vorgänge vor dem Hintergrund eines autoimmunen Prozesses <i>in vitro</i>	62
6.2.1. Hypothese 2: Einfluss der Autoantigene auf die Immunzellen <i>in vitro</i>	62
6.3. Ziel III: Validierung der <i>in vitro</i> generierten Ergebnisse im NSG-Mausmodell.....	65
6.3.1. Hypothese 3.1. und 3.2: Auswirkung der Antigene auf die klinische Aktivität.....	65
6.3.2. Hypothese 3.3: Untersuchung des Effektes der Antigene auf das immunologische Profil der NSG-Maus	65
6.4. Ziel IV: Beeinflussung der immunologischen Vorgänge durch die Testung ausgewählter Immunmodulatoren im NSG-Mausmodell	67
6.4.1. Hypothese 4.1: Auswirkung von Sirolimus auf die klinische Aktivität	68
6.4.2. Hypothese 4.2: Einfluss von Sirolimus auf die Immunzellen	68
6.4.3. Hypothese 4.3: Beeinflussung des Zytokinprofils der NSG-Maus durch Sirolimus.....	70
6.4.4. Hypothese 4.4: Beeinflussung des immunologischen Profils durch Sirolimus in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität der Spender.....	70
7 Zusammenfassung.....	72
8 Summary.....	74
9 Anhang	76
9.1. Gatingstrategie	76
9.2. FACS-Antikörper.....	81
9.3. Tabellen zur statistischen Auswertung	82
9.4. R-Skripte.....	91
9.5. Herstellerangaben	93
10 Literaturangaben.....	97
11 Danksagung.....	111

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
APC	Allophycocyanin, Farbstoff für die Durchflusszytometrie
CCL17	Chemokin Ligand 17, TARC
CD	<i>Crohn's disease, Morbus Crohn</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung, <i>IBD</i>
CRP	C-reaktives Protein
DC	dendritische Zelle
DSS	<i>Dextran Sodium Sulfat</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell scanning</i> , Durchflusszytometrie
FoxP3	<i>forkhead-box</i> Protein 3, Transkriptionsfaktor
GATA3	Transkriptionsfaktor, bindet an DNA-Sequenz „GATA“
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IFN γ	Interferon γ
JAK	Januskinase
Ma	Makrophage
MHC I	<i>major histocompatibility complex I</i>
MHC II	<i>major histocompatibility complex II</i>
Mo	Monozyt
mTARC	murines TARC
mTGF β	murines TGF β
NK	natürliche Killerzelle
NK-T	natürliche Killer T-Zelle
NOD Rezeptor	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i> Rezeptor
NSG-Maus	NOD-scid IL2R γ -chain ^{null} -Maus
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
pANCA	perinukleären antineutrophilen cytoplasmatischen Antikörper
PBMC	periphere mononukleäre Zellen des Blutes

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE Cy7	Phycoerythrin Cyanin, Farbstoff für die Durchflusszytometrie
PerCP Cy 5.5	Peridinin Chlorophyll Protein Cyanin, Farbstoff für die Durchflusszytometrie
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
Pr3	Proteinase 3
ROR γ t	<i>RAR-related orphan receptor γ</i> , Transkriptionsfaktor
SCCAI	<i>simple clinical colitis activity index</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i> , Transkriptionsfaktor
TARC	thymusaktivitätreguliertes Chemokin, CCL17
Tbet	Transkriptionsfaktor
TCR	<i>t-cell receptor</i>
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
TH0	naive T-Helferzelle
TH1	T-Helferzelle Typ 1
TH2	T-Helferzelle Typ 1
TH17	T-Helferzelle, produzieren IL-17
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Treg	regulatorische T-Zelle
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
TSLPR	Rezeptor für TSLP
UC	<i>ulcerative colitis, Colitis ulcerosa</i>
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> Polymerasekettenreaktion

1 Einleitung

Colitis ulcerosa und *Morbus Crohn* gehören zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. In Deutschland liegt die Inzidenz an Kolitis zu erkranken bei 3,0 - 3,9 pro 100000 Einwohner (DIGNASS et al. 2011). Die Diagnose *Colitis ulcerosa* wird häufig bei sehr jungen Patienten gestellt. Diese sind durch die immer wiederkehrenden Entzündungsschübe in ihrem Alltag stark eingeschränkt. In der Regel bedarf es einer lebenslangen medikamentösen Therapie, um einen Zustand der Remission zu erlangen und zu erhalten. Trotz mehrerer zur Wahl stehender Medikamente entwickeln viele Patienten eine therapierefraktäre Kolitis. Als letzte Behandlungsmöglichkeit bleibt oft nur die chirurgische Resektion des Kolons und des Rektums.

In diesem Zusammenhang ist ein besseres Verständnis der krankheitsassoziierten Pathomechanismen unerlässlich, um weitere nicht-invasive Therapiemöglichkeiten erforschen zu können.

Gerade auf der immunologischen Ebene ist längst noch nicht genau geklärt, welche Abläufe zu der Entstehung der überschießenden Immunreaktion führen. Autoantikörper wie anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper und Antikörper gegen Pankreaszellen wurden in Kolitis-Patienten identifiziert (MITSUYAMA et al. 2016). Die Vermutung liegt deshalb nahe, dass Autoimmunität im Entzündungsprozess von *Colitis ulcerosa* auch eine Rolle spielt.

Um die immunologischen Abläufe zu untersuchen, hat sich die Entwicklung translationaler Tiermodelle als sehr nützlich erwiesen. Diese sind nicht nur geeignet, um das immunologische Verständnis zu verbessern, sondern auch um neue Therapeutika vor den klinischen Phase II Studien zu testen.

Im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens soll untersucht werden, inwieweit die Entzündung bei *Colitis ulcerosa* durch die Ausbildung einer Autoimmunität beeinflusst wird. Anhand der Autoantigene Pr3 und CD99 wird der Einfluss auf die Immunzellen *in vitro* und in einem Tiermodell mit humanisierten NOD-scid IL2R γ -chain^{null} Mäusen (NSG) betrachtet. In diesem Zusammenhang soll weiterhin geklärt werden, wie die regulatorischen Mechanismen der Immunantwort beeinflusst werden können.

2 Literaturübersicht

2.1. *Colitis ulcerosa*

2.1.1. Definition und Bedeutung

Colitis ulcerosa gehört zusammen mit *Morbus Crohn* zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Charakteristisch für chronische Entzündungen des Darms sind immer wiederkehrende Entzündungen des Kolons (CORRIDONI et al. 2014). Während bei *Morbus Crohn* alle Darmschichten betroffen sind, beschränken sich die entzündlichen Veränderungen bei *Colitis ulcerosa* in der Regel auf die Dickdarmmukosa (ABRAHAM u. CHO 2009). Betroffen sind meist junge Patienten, die bei Diagnosestellung zwischen 15 und 30 Jahre alt sind (LOFTUS u. SANDBORN 2002). Blutige Durchfälle und abdominale Krämpfe stellen hierbei typische Symptome dar (BAUMGART u. SANDBORN 2007).

2.1.2. Epidemiologie

Das Krankheitsbild *Colitis ulcerosa* wurde erstmalig 1859 von dem britischen Arzt Sir Samuel Wilks beschrieben (WILKS 1859). Auffallend ist eine hohe Inzidenz und Prävalenz von Kolitis in Nordeuropa, Nordamerika und Großbritannien. Geschlechterspezifische Unterschiede der Krankheitsfälle wurden nicht festgestellt (MATRICON et al. 2010). In Deutschland liegt die Inzidenz an Kolitis zu erkranken bei 3,0 - 3,9/100000 Einwohner (DIGNASS et al. 2011). Interessanterweise ist die Krankheitswahrscheinlichkeit in Entwicklungsländern und in Ländern mit langsam voranschreitender Industrialisierung geringer (LOFTUS 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der ethnische Hintergrund ebenfalls das Auftreten der Krankheit beeinflusst (NGUYEN et al. 2006). Trotz der hohen Prävalenz und Inzidenz ist die Lebenserwartung von Kolitis-Patienten nicht verringert (MATRICON et al. 2010).

2.1.3. Ätiologie

Auch wenn die genaue Ursache von *Colitis ulcerosa* nicht genau geklärt ist, konnten einige Faktoren identifiziert werden, die zur Krankheitsentstehung beitragen.

Genetik

Bisher sind 163 *Genloci* bekannt, die unter anderem für das Auftreten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen verantwortlich sind (JOSTINS et al. 2012). In genomweiten Assoziationsstudien konnten 47 *Loci* identifiziert werden, die mit Kolitis in Verbindung gebracht werden können (ANDERSON et al. 2011). Inwiefern ein gehäuftes familiäres Auftreten von chronischen Entzündungen verbreitet und aussagekräftig ist, muss weiter analysiert werden (CHILDERS et al. 2014). Das Risiko an *Morbus Crohn* zu erkranken, scheint im Vergleich zu *Colitis ulcerosa* bei Verwandten ersten Grades erhöht zu sein (RUSSELL u. SATSANGI 2004). Dies wird besonders deutlich, wenn die Krankheitsprävalenz bei eineiigen Zwillingen betrachtet wird. Hier liegt das Risiko an *Morbus Crohn* zu erkranken bei 50-60%, bei Kolitis hingegen lediglich bei 6-18%. In diesem Fall sollte auch bedacht werden, dass nähere Verwandte unter ähnlichen Umweltbedingungen leben, so dass nicht ausschließlich die genetische Veranlagung für ein Krankheitsauftreten verantwortlich sein kann (CHILDERS et al. 2014).

Umweltfaktoren und Lebensstil

Verschiedene Umweltfaktoren und -einflüsse spielen bei der Entstehung von *Colitis ulcerosa* ebenfalls eine Rolle.

Betrachtet man die Inzidenz, scheint ein gewisses Verteilungsgefälle in Bezug auf das Auftreten der Krankheit zwischen Norden und Süden zu bestehen: In Nordamerika und Nordeuropa tritt *Colitis ulcerosa* weitaus häufiger auf, als beispielsweise in Südamerika, Südostasien oder Afrika (LOFTUS 2004). Dies kann auf den verminderten Grad der Industrialisierung und die damit verbundene Gesundheitsvorsorge, Hygiene oder das Vorhandensein von Sanitäreinrichtungen zurückgeführt werden. Eine verringerte Exposition gegenüber Umweltantigenen in den Industrienationen führt zu einer verminderten Entwicklung des gastrointestinalen Immunsystems und geringerer Immuntoleranz (BAUMGART u. CARDING 2007).

Eine fett- und kohlenhydratreiche sowie ballaststoffarme Ernährung wird ebenfalls in Zusammenhang mit der Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gebracht (CHAPMAN-KIDDELL et al. 2010). In Vergleichsstudien konnte mittels DNA-

Sequenzierung gezeigt werden, dass afrikanische Kinder, die sich sehr ballaststoffreich ernähren, gegenüber Kindern in Europa, eine andere Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora aufweisen (DE FILIPPO et al. 2010). Demnach scheint das Darmmikrobiom durch die Ernährungsweise beeinflusst werden zu können (MUEGGE et al. 2011). Konkrete wissenschaftliche Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Ernährungsweise und dem Entzündungsverlauf herstellen, fehlen. Dennoch beeinflusst die Ernährung nach dem subjektiven Empfinden der Patienten die Symptomatik der Erkrankung (COHEN, A. B. et al. 2013).

Lipidmediatoren wie beispielsweise Omega 3 Fettsäuren wurden in der Vergangenheit ebenfalls als Riskofaktoren für Kolitis betrachtet. In einem *Dextran Sodium Sulfat*-Kolitis Modell konnte jedoch gezeigt werden, dass es zu einem Abfall inflammatorischer Zytokine und zur Bildung anti-inflammatorischer Resolvine kommt (CALVIELLO et al. 2013).

Häufig entwickelt sich eine Kolitis nach gastrointestinalen Infekten. Hierbei wird vermutet, dass das vermehrte Auftreten von Bakterien zur Störung des immunologischen Gleichgewichtes der Dickdarmmukosa führt und so die Entzündung bedingt. Auch wenn vor allem Salmonellen- und *Campylobacter*-Infektionen auftreten, kann keine Spezies ursächlich mit der Krankheitsentstehung in Verbindung gebracht werden (GARCIA RODRIGUEZ et al. 2006).

Interessanterweise verringert Nikotinkonsum das Risiko an *Colitis ulcerosa* zu erkranken, da er zu einer vermehrten Mukusproduktion und zu einer verringerten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine führt (COSNES 2004).

Immunschwäche

Nach einer akuten Gastroenteritis, ausgelöst durch *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. oder *Shigella* sp., ist das Risiko an Kolitis zu erkranken signifikant erhöht (GARCIA RODRIGUEZ et al. 2006). In einer dänischen Studie stand das Risiko an *Colitis ulcerosa* zu erkranken jedoch in keinem Zusammenhang mit einem negativen oder positiven Testergebnis. Vielmehr könnte die hohe Probenzahl von Kolitis-Patienten zu positiven Ergebnissen geführt haben (JESS et al. 2011). Nichtsdestotrotz könnte eine akute gastrointestinale Infektion zu einer Veränderung der Mikroflora führen (SASAKI u. KLAPPROTH 2012). So könnten bakterielle Pathogene eine überschießende Immunreaktion auslösen, die letztendlich zu einer chronischen Entzündung führt (GARCIA RODRIGUEZ et al. 2006).

2.1.4. Pathogenese

Ähnlich wie die Ätiologie ist auch die Pathogenese nicht vollständig geklärt. Es ist davon auszugehen, dass die Immunabwehr auf Epithelebene gestört ist und veränderte Reaktionen der angeborenen und erworbenen Immunantwort hervorgerufen werden (MATRICON et al. 2010).

Die Bedeutung des Magen-Darmtraktes aus immunologischer Sicht wird allein durch die Tatsache deutlich, dass 70 % des gesamten Immunsystems hier lokalisiert sind (VIGHI et al. 2008).

Die Darmschleimhaut ist ständig verschiedensten Antigenreizen aus der Nahrung oder bakteriellen Ursprungs ausgesetzt (GILL et al. 2006). Die Aufgabe des gastrointestinalen Immunsystems besteht darin, das Gleichgewicht zwischen Erregerabwehr einerseits und Toleranz gegenüber Antigenen der Kommensalfloora andererseits aufrecht zu erhalten (GEREMIA et al. 2014).

Ist diese Balance gestört, reagiert das Immunsystem auch gegen die darmeigene Bakterienflora, da luminale Antigene auf diesem Weg über das geschädigte Epithel in das darunterliegende Gewebe gelangen (BAUMGART u. CARDING 2007).

Das Epithel des Darms ist von einer Muzinschicht bedeckt und stellt die erste physikalische Barriere des intestinalen Abwehrsystems dar. In der Muzinschicht befinden sich neben den kommensalen Bakterien auch antimikrobielle Peptide, die unter anderem von den Epithelzellen produziert werden, und von Plasmazellen in der *Lamina propria* produziertes IgA. Die darunterliegende Epithelschicht setzt sich aus epithelialen Stammzellen, Enterozyten, Becherzellen, Paneth-Zellen und M-Zellen zusammen (PETERSON u. ARTIS 2014). Diese Zellen sind durch *tight junctions*, *adherens junctions* und Desmosomen miteinander verbunden und für den parazellulären Transport von Makromolekülen verantwortlich (GROSCWITZ u. HOGAN 2009). Stromazellen, B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen befinden sich unterhalb des Epithels in der *Lamina propria* (ABREU 2010).

Bei Kolitis ist diese erste physikalische Barriere gestört. Es werden weniger muzinproduzierende Becherzellen nachgewiesen, so dass die Schutzfunktion nicht aufrecht erhalten werden kann (MATRICON et al. 2010). Beschrieben wurde auch eine Lockerung der Zellverbände und eine damit verbundene erhöhte Permeabilität sowohl in Tiermodellen als auch bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (BRUEWER et al. 2006). Luminale Antigene gelangen in die *Lamina propria* und lösen dort eine Immunreaktion aus, die letztendlich zu einem entzündlichen Gewebeschaden führt (GARCIA RODRIGUEZ et al.

2006). Die Entzündung kann sich bis hin zu einer Chronizität entwickeln, die Strukturveränderungen des Gewebes und extraintestinale Manifestationen bedingt (Abbildung 1).

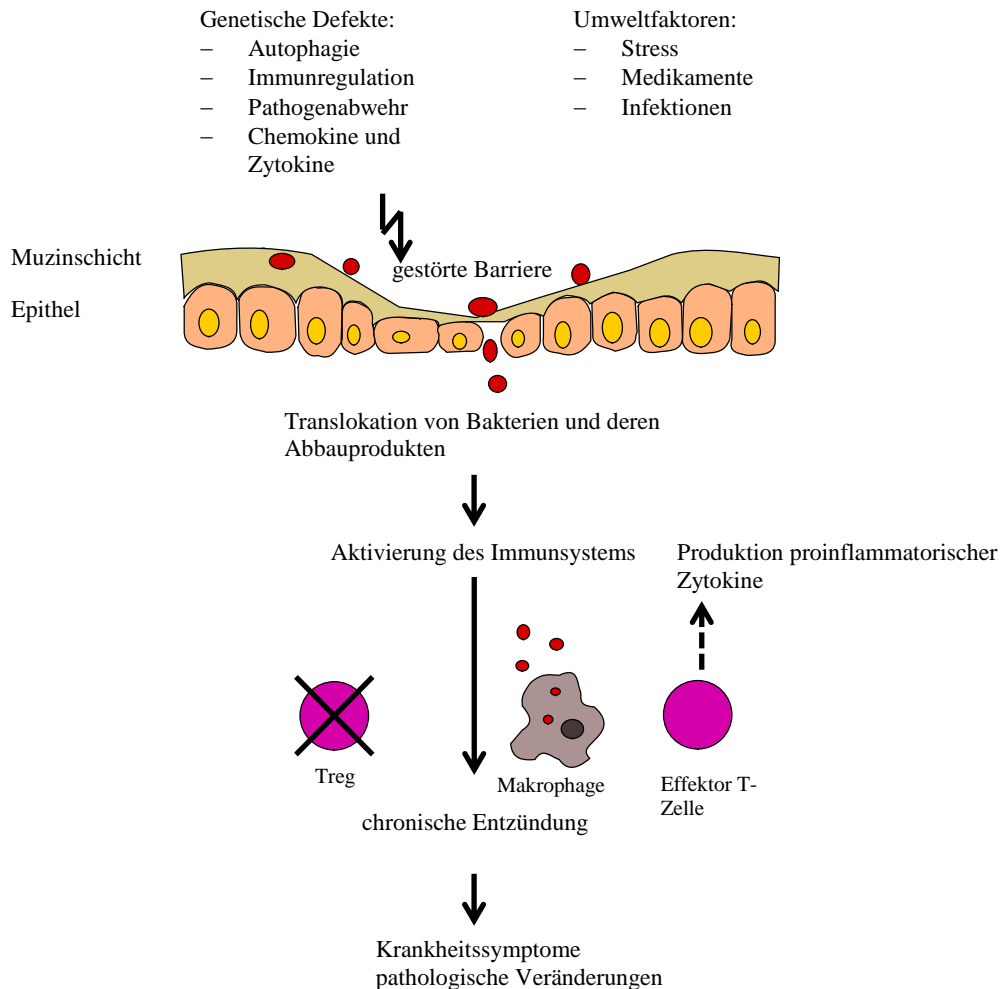


Abbildung 1: Zusammenfassende Darstellung der Krankheitsentstehung (modifiziert nach NEURATH 2014). Durch bestimmte prädisponierende Faktoren (Genetik, Umwelt) und eine gestörte epitheliale Barriere dringen Pathogene in das Gewebe ein. Die nachfolgende Immunreaktion hat die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine zur Folge, der regulatorische Teil der Immunabwehr hingegen wird unterdrückt. Es kommt zu einer Entzündungsreaktion, die sich bis hin zur Ausbildung einer Chronizität entwickeln kann. Es treten Krankheitssymptome wie Durchfälle, Fieber und Blutarmut auf. Folgen sind die Fibrosierung des Gewebes, extraintestinale Manifestationen aber auch ein erhöhtes Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken.

2.2. Klinik

2.2.1. Klassifizierung

Eine Klassifizierung der *Colitis ulcerosa* bildet die Grundlage für die bestmögliche Therapie, aber auch die Überwachung möglicher Komplikationen und Spätfolgen. (DIGNASS et al. 2011).

Nach der Montreal-Klassifikation erfolgt eine Einteilung aufgrund der anatomischen Ausbreitung und des Schweregrades (Tabelle 1 und 2) (SATSANGI et al. 2006).

Tabelle 1: Einteilung anhand der anatomischen Ausbreitung

E1	Proktitis	auf das Rektum beschränkt, bis zum rektosigmoidalen Übergang
E2	Linksseitenkolitis	Ausbreitung bis maximal zur linken Flexur
E3	Pankolitis	Ausbreitung über linke Flexur hinaus

Tabelle 2: Einteilung anhand des Schweregrades

S0	Remission	Keine Symptome
S1	mild	Stuhlgang <4/Tag (mit und ohne Blut), keine systemischen Beschwerden, Entzündungswerte im Normbereich
S2	moderat	Stuhlgang >4/Tag, geringgradige Störungen des Allgemeinbefindens
S3	schwer	Stuhlgang >6/Tag, gestörtes Allgemeinbefinden, erhöhte Entzündungswerte

2.2.2. Klinischer Verlauf

Der Krankheitsverlauf von *Colitis ulcerosa* ist gekennzeichnet durch akute Krankheitsschübe, die in Phasen der Remission übergehen (DIGNASS et al. 2011). In seltenen schweren Fällen kommt es zu einem kontinuierlichen Krankheitsverlauf ohne Remission. Das Auftreten eines einzelnen akuten Schubes gefolgt von einer langen Remissionsphase ist ebenso möglich (LANGHOLZ et al. 1994).

In einer Studie wurden 1161 Probanden über einen Zeitraum von bis zu 25 Jahren nach Diagnosestellung begleitet. Es konnte gezeigt werden, dass sich ca. 50 % der Patienten jedes Jahr in Remission befanden, wobei in 90 % der Fälle ein intermittierender Krankheitsverlauf vorlag. In den ersten sieben Jahren nach der Diagnose befanden sich 25 % der Patienten in Remission, 18% hatten jedes Jahr einen akuten Schub und 57 % zeigten einen intermittierenden Verlauf (LANGHOLZ et al. 1994).

Neben Störungen des Allgemeinbefindens wie Fieber, Appetit- und Gewichtsverlust sind auftretende Symptome häufiger Stuhlgang, Durchfälle (eventuell blutig oder mit Schleimbeimengungen), abdominale Krämpfe und Tenesmen. Im Falle einer mit Kolitis einhergehenden Entzündung des Rektums können auch Konstipationen auftreten (BERNSTEIN et al. 2010).

In klinischen Studien erfolgt die Beurteilung der Krankheitsaktivität anhand des Mayo-Scores. Mit Hilfe eines Punktesystems werden Stuhlgang, rektale Blutungen, endoskopische Befunde und die ärztliche Beurteilung bewertet (LEWIS et al. 2008). Hierbei wird unterteilt in: Remission (0-2 Punkte), einen milden (3-5 Punkte), moderaten (6-10 Punkte) oder schweren Verlauf (11-12 Punkte) (PEYRIN-BIROULET et al. 2016).

Es existiert keine Definition einer fulminanten Kolitis, hierunter wird aber eine schwere Verlaufsform verstanden, die von hohem Fieber, Blutungen, stark erhöhten Entzündungsparametern und Gewichtsverlust begleitet ist. Einige Patienten entwickeln ein toxisches Megakolon (BAUMGART u. SANDBORN 2007).

2.2.3. Diagnose

Die Unterscheidung zwischen *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa* ist in manchen Fällen nicht eindeutig. Lebensmittelunverträglichkeiten oder andere entzündliche Erkrankungen müssen zunächst ausgeschlossen werden, weshalb eine richtige Diagnosestellung in Hinblick auf die Therapie von großer Bedeutung ist. Idealerweise wird die Diagnose *Colitis ulcerosa* anhand

der Befunde aus Anamnese, klinischer Untersuchung und Labordiagnostik, Endoskopie, Sonografie, Radiologie und Histopathologie gestellt (DIGNASS et al. 2011).

Anamnese und klinische Untersuchung

Im Hinblick auf die Symptome sollten auch Nahrungsmittelunverträglichkeiten, infektiöse Erkrankungen, Reiseerkrankungen oder Arzneimittelunverträglichkeiten abgeklärt werden. Des Weiteren wird im speziellen der perianale Bereich untersucht, aber auch Mund, Augen, Haut und Gelenke, um eventuelle extraintestinale Manifestationen beurteilen zu können (BERNSTEIN et al. 2010)

Labordiagnostik

Calprotectin weist auf eine intestinale Entzündung hin und korreliert positiv mit dem Entzündungsgrad (SCHOEPFER et al. 2009). Bei einem milden Krankheitsverlauf sowie bei einer Proktitis ist es möglich, dass keine auffälligen Laborwerte festgestellt werden können. Mit Zunahme der klinischen Symptome kommt es zu einem schwachen Anstieg des C-reaktiven Proteins. Eine Routinebestimmung von perinukleären antineutrophilen cytoplasmatischen Antikörpern (pANCA) und anti-*Saccharomyces cerevisiae* Antikörpern (ASCA) um *Colitis ulcerosa* und *Morbus Crohn* zu unterscheiden, erscheint wegen der geringen Sensitivität nicht sinnvoll (PLEVY 2004). Im Einzelfall scheint die Bestimmung dennoch nützlich zu sein. In einer großangelegten Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass ein Nachweis von pANCA zu 94 % spezifisch für die Diagnose Kolitis ist (REESE et al. 2006).

Endoskopie

Die Endoskopie und die damit verbundene Probengewinnung aus dem Kolon und anschließende histologische Beurteilung, stellt einen wichtigen Teil der Diagnosestellung dar. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf Entzündungsanzeichen, Ulzerationen, Blutungen und Stenosen (BERNSTEIN et al. 2010).

Histopathologie

Histologisch ist die Entzündung auf die Kolonmukosa beschränkt. Charakteristisch ist eine Infiltration durch neutrophile Granulozyten. Dies kann das Epithel der Krypten betreffen (*Kryptitis*) oder eine Ansammlung von Neutrophilen im Lumen (Kryptabszess) bedeuten.

Weiterhin können Ulzera, Entzündungszellen in der *Lamina propria mucosae* und Kryptarchitekturveränderungen auftreten (DEROCHE et al. 2014).

2.2.4. Therapie

Die Diagnose und die Lokalisation der Entzündung bestimmen den Therapieansatz. Ziel ist es, Patienten in Remission zu bringen und diese aufrecht zu erhalten (BAUMGART u. SANDBORN 2007).

Medikamentöse Therapie

Bei einem milden bis moderaten Krankheitsverlauf stellt Mesalazin (5-ASA, *5-aminosalicylic acid*) das Mittel der Wahl für die Einleitung der Remission dar (CARTER et al. 2004). Es konnte kein Unterschied in Absorption und systemischer Nachweisbarkeit zwischen oralen und rektalen Formulierungen oder oralen *pro-drugs* festgestellt werden (SANDBORN u. HANAUER 2003). Eine *Proktitis* und eine Linksseitenkolitis sprechen besser auf rektale Formulierungen von Mesalazin an (BAUMGART u. SANDBORN 2007). Patienten, die nicht auf orale oder rektale Mesalazin-Therapie ansprechen, sollten orale Kortikosteroide (wie zum Beispiel Prednisolon) appliziert werden (LICHTENSTEIN et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass 34 % der Patienten Kortikosteroide benötigen, um in Remission zu gelangen. Nach einem Jahr kam es bei 49 % zu einem verringerten Ansprechen, bei 22 % zu Steroidabhängigkeit und 29 % benötigten eine chirurgische Therapie (FAUBION et al. 2001). Moderate bis schwere Verläufe können auch mit Infliximab, einem TNF α -Blocker, behandelt werden (RUTGEERTS et al. 2005). Patienten mit einem schweren Krankheitsverlauf oder solche, die nicht auf eine orale Kortikosteroidtherapie ansprechen, sollten auf systemische Kortikosteroide umgestellt werden (CARTER et al. 2004). Sollte auch eine systemische Gabe keinen Erfolg haben, können Ciclosporine, Tacrolimus und Infliximab verabreicht werden (BAUMGART u. SANDBORN 2007).

Um die Remission aufrecht zu erhalten, bietet sich Mesalazin an. Bei fehlendem Ansprechen auf Mesalazin, Steroidabhängigkeit oder Induktion durch Ciclosporine oder Tacrolimus kann eine Behandlung mit Azathioprinen oder Mercaptopurinen sinnvoll sein (CARTER et al. 2004). Infliximab eignet sich ebenso zur Remissionserhaltung (RUTGEERTS et al. 2005).

Chirurgie

Bei lebensbedrohlichen Komplikationen wie Perforationen, kontinuierlichen rektalen Blutungen und toxischem Megakolon ist eine Operation unumgänglich (BERG et al. 2002).

Auch bei einer Dysplasie, Karzinomen oder generell schlechtem Ansprechen auf die medikamentöse Therapie sollte ein chirurgischer Eingriff in Betracht gezogen werden. Die anerkannte Methode der Wahl stellt die Proktokolektomie mit ileopouchanaler Anastomose dar (LARSON u. PEMBERTON 2004).

2.2.5. Komplikationen und Spätfolgen

Gerade bei schweren Verlaufsformen können sich Komplikationen entwickeln. Eine retrospektive Studie zeigte, dass 12 % der Kolitis-Patienten wegen Hämorrhagien, Perforationen oder eines toxischen Megakolons operiert werden mussten (LONGO et al. 2003). Das Risiko eines kolorektalen Karzinoms ist signifikant erhöht, besonders bei einem frühen Krankheitsbeginn, langer Krankheitsdauer und bei familiärem Auftreten (BERNSTEIN et al. 2010). Komplikationen nach einer Proktokolektomie mit ileopouchanaler Anastomose können unter anderem eine *Pouchitis*, Inkontinenz und Sepsis sein (HUETING et al. 2005).

2.3. Immunologische Vorgänge

2.3.1. Angeborene Immunantwort

Die Muzinschicht, das Epithel und die Zellen des angeborenen Immunsystems stellen den ersten Abwehrmechanismus des Immunsystems dar (Abbildung 2). Die Antwort des angeborenen Immunsystems auf eingedrungene Pathogene ist eine schnelle und unmittelbar nach Antigen-Kontakt ablaufende Reaktion (BAUMGART u. DIGNASS 2002). Sie erfolgt unspezifisch und resultiert nicht in der Ausbildung einer langanhaltenden Immunität (GEREMIA et al. 2014). *Pattern recognition receptors* (PRR), insbesondere *toll-like receptors* (TLR), der Epithelzellen erkennen *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) von Erregern und aktivieren Epithelzellen. Diese produzieren daraufhin β -Defensine und exprimieren *major histocompatibility complex*-Moleküle (MHC), die die mukosale Immunantwort initiieren (MATRICON et al. 2010). TLRs tragen zur Aufrechterhaltung der Homeostase und einer intakten epithelialen Barriere bei (ABREU 2010). Nach der Antigenerkennung wird über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B die inflammatorische Zytokinkaskade in Gang gesetzt (KAWAI u. AKIRA 2007).

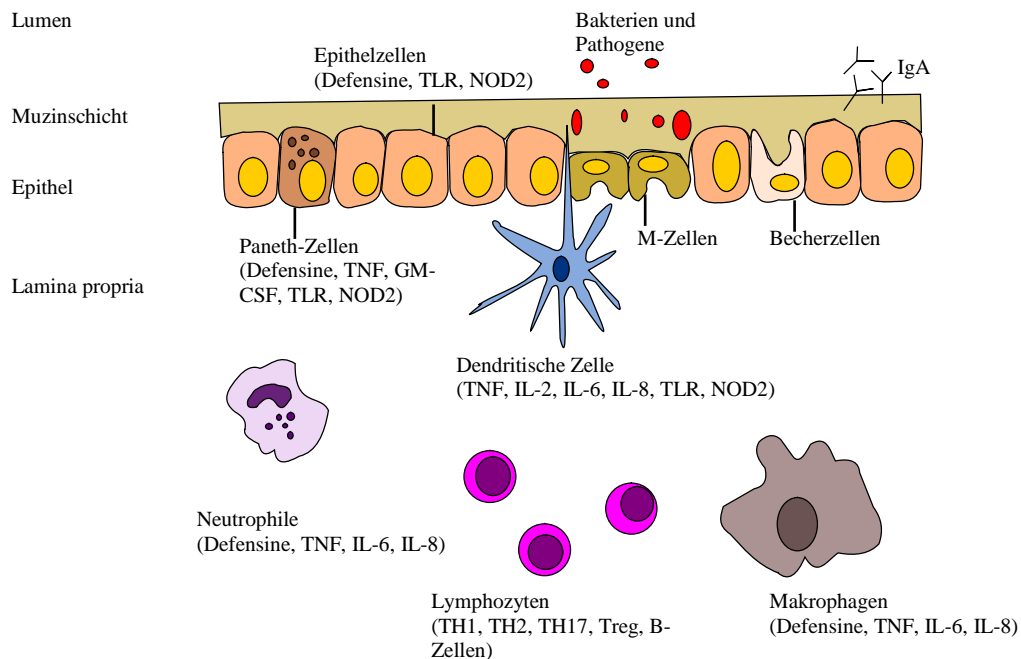


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus des Epithels und weiterer zellulärer Bestandteile der Immunantwort (modifiziert nach MATRICON et al. 2010). Das von Becherzellen produzierte Mucin und das Epithel stellen eine erste physikalische Barriere gegen eindringende Pathogene dar. Sekretorisches IgA dient ebenfalls der Erregerabwehr. Die Epithelzellen produzieren Defensine und tragen *pattern recognition receptors* wie TLR und NOD2. Panethzellen produzieren ebenso Defensine und andere Faktoren wie TNF und GM-CSF, die das Immunsystem aktivieren. Aktivierte antigenpräsentierende Zellen regen durch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine die Differenzierung naiver T-Zellen an. TLR=*toll like* Rezeptoren; NOD= *nucleotide-binding oligomerization domain*; TNF=Tumornekrosefaktor; GM-CSF=*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

Phagozyten wie Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen stellen zusammen mit Natürlichen Killerzellen und natürlichen Killer T-Zellen den zellulären Teil des angeborenen Immunsystems dar.

Monozyten und Makrophagen beseitigen Pathogene mittels Phagozytose oder regen weitere immunologische Reaktionen über die Bindung von PRRs an PAMPs an. Eine unpassende Aktivierung der Rezeptoren führt zu einer Entzündung, die letztendlich auch in einer ulzerativen Kolitis enden kann (GREN u. GRIP 2016). Monozyten stammen von hämatopoetischen Stammzellen ab. Sie zirkulieren durch das Blut, bevor sie, durch IL-8 und TGF β mobilisiert, in das Gewebe gelangen. Dort differenzieren sie weiter und regenerieren Gewebemakrophagen (SMYTHIES et al. 2006). Monozyten können in drei Untergruppen eingeteilt werden: CD14^{hi}CD16⁻ sind die klassischen im Blut zirkulierenden Monozyten,

CD14^{hi}CD16⁺ Monozyten stellen eine Zwischenform dar und CD14⁺CD16^{high} werden als nichtklassische Monozyten bezeichnet (ZIEGLER-HEITBROCK et al. 2010).

Die klassischen Monozyten differenzieren zu *tissue-resident* Makrophagen, die als CD14^{low}HLADR^{high}CD163^{high}CD64⁺ charakterisiert werden (GREN u. GRIP 2016).

In Abhängigkeit von ihrer Umgebung ändern Makrophagen ihren Phänotyp und ihre Funktion. *Tissue-resident* Makrophagen der *Lamina propria* phagozytieren Pathogene ohne eine weitere Immunreaktion auszulösen und tragen so zur Homeostase im Darm bei (KUHL et al. 2015). Inflammatorische Makrophagen werden in Abhängigkeit von ihrer Aktivierung in M1 und M2 Makrophagen unterteilt. M1 Makrophagen wirken inflammatorisch, M2 Makrophagen hingegen fördern den Wundheilungsprozess (MARTINEZ u. GORDON 2014). Dendritische Zellen sind ebenfalls antigenpräsentierende Zellen und entwickeln sich mit den Monozyten aus gemeinsamen Vorläuferzellen (Abbildung 3). Sie sind mitunter für die Differenzierung der TH0-Zellen zu regulatorischen T-Zellen verantwortlich und somit für die Toleranz gegenüber der Kommensalfloora. Durch eine Überaktivierung der dendritischen Zellen wird eine Differenzierung der Effektorzellen angeregt, die regulatorischen T-Zellen hingegen werden vernachlässigt. Dadurch richtet sich die Immunantwort auch gegen die darmeigene Mikroflora und es kommt zu einem Toleranzverlust (MATRICON et al. 2010).

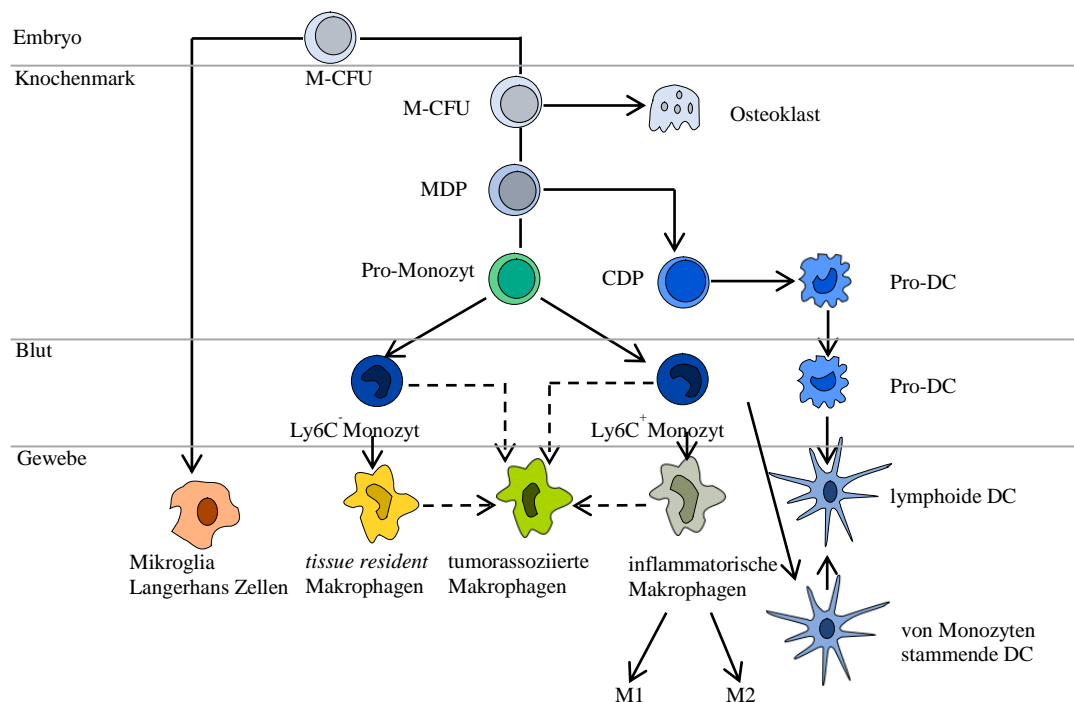


Abbildung 3: Darstellung der Entwicklung von Makrophagen und dendritischen Zellen aus gemeinsamen Vorläuferzellen in der Maus (modifiziert nach LAWRENCE u. NATOLI 2011). Myeloide *colony-forming units* (M-CFU) sind hämatopoetische Stammzellen, die sich zu Vorläuferzellen von Makrophagen und dendritischen Zellen entwickeln (MDP). Aus den eigentlichen Vorläuferzellen der dendritischen Zellen (CDP) entwickeln sich Pro-DC, die nach dem Übertritt in das Gewebe als lymphoide dendritische Zellen vorliegen. Neben den CDPs entwickeln sich aus MDPs auch Pro-Monozyten. Diese werden je nach Oberflächenmarker im Blut als Ly6C⁻ Monozyten oder Ly6C⁺ Monozyten bezeichnet. Aus Ly6C⁺ Monozyten können sich ebenfalls dendritische Zellen entwickeln. Die meisten Gewebemakrophagen entwickeln sich aus Ly6C⁻ Monozyten, wohingegen Ly6C⁺ Monozyten durch das Auftreten von Entzündungen zur Differenzierung in inflammatorische Makrophagen angeregt werden. In Abhängigkeit von dem Milieu können Subtypen von inflammatorischen Makrophagen unterschieden werden. M1 Makrophagen wirken proinflammatorisch, M2 Makrophagen hingegen fördern die Wundheilung und wirken antiinflammatorisch. DC=dendritische Zelle; M-CFU= myeloide *colony-forming units*; CDP= *common DC progenitor*; MDP=*monocyte/macrophage DC progenitor*

2.3.2. Adaptive Immunantwort

Im Gegensatz zu der angeborenen Immunantwort erfolgt die adaptive Immunantwort hochspezifisch durch T- und B-Zellen und resultiert in der Ausbildung einer langanhaltenden Immunität. T-Zellen werden in CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen eingeteilt (KORETZKY 2010).

Naive CD4⁺ TH0-Zellen werden durch antigenpräsentierende Zellen, wie beispielsweise dendritische Zellen aktiviert. Über die spezifische Bindung des mit Antigen beladenen

MHC II-Moleküls an den T-Zell-Rezeptor und in Abhängigkeit von dem Zytokinmilieu differenzieren naive T-Zellen zu TH1, TH2, TH17-Zellen oder regulatorischen T-Zellen (KAIKO et al. 2008). Die T-Zell-Differenzierung verläuft über den JAK/STAT-Signalweg (Abbildung 4). Hierbei wird durch die Bindung eines Zytokins an den entsprechenden Rezeptor auf der TH0-Zelle die Januskinase (JAK) phosphoryliert und somit aktiviert. Im aktiven Zustand können nun *signal transducer and activator of transcription* (STAT) Proteine ebenfalls phosphoryliert und aktiviert werden. Intrazellulär arbeiten diese nun als Transkriptionsfaktoren und führen zu der Expression bestimmter Zielgene und zur Spezialisierung der T-Zelle (SHUAI u. LIU 2003).

Eine fehlerhaft regulierte Aktivierung von T-Zellen kann durch das Freisetzen von Zytokinen und Chemokinen, die sowohl auf das angeborene und das adaptive Immunsystem einwirken, eine Entzündungsreaktion hervorrufen (GEREMIA et al. 2014).

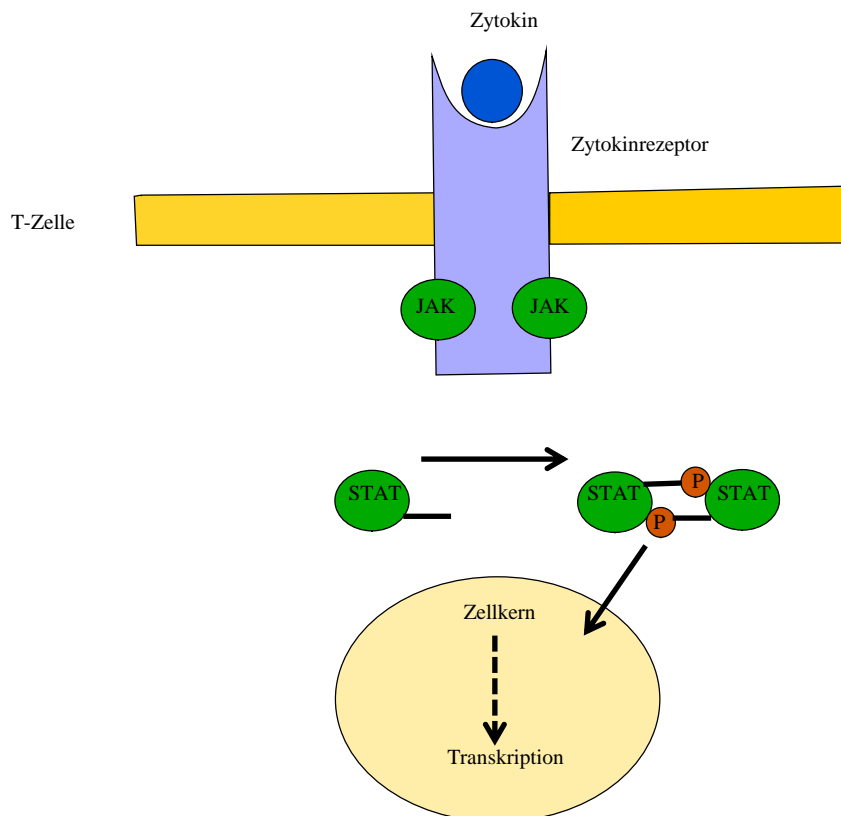


Abbildung 4: schematische Darstellung des JAK/STAT-Signalweges (modifiziert nach SHUAI u. LIU 2003). Durch Bindung eines Zytokins an den spezifischen Zytokinrezeptor der T-Zelle, wird die Januskinase aktiviert und führt zu einer Phosphorylierung der STAT-Proteine. Diese bilden Dimere und können nun im Zellkern die Gentranskription beeinflussen. JAK=Januskinase; STAT= *signal transducer and activator of transcription*

TH1 und TH2-Zellen

Morbus Crohn wird als TH1-vermittelte Immunreaktion beschrieben, wohingegen *Colitis ulcerosa* als TH2-vermittelte Immunantwort bezeichnet wird (DI SABATINO et al. 2012). Jedoch konnte gezeigt werden, dass dies keine feste Einteilung ist, da *ex vivo* auch gemischte Zytokin-Profile möglich sind, die sich weder einer TH1- noch TH2-Antwort zuordnen lassen (BERNARDO et al. 2012).

Die Differenzierung der TH0-Zellen zu TH1-Zellen wird durch IL-12 und IFN γ induziert. Durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT4 wird der für TH1-Zellen typische Transkriptionsfaktor Tbet exprimiert (SUMMERS et al. 2011). TH1-Zellen sind durch die Produktion von IFN γ und IL-2 gekennzeichnet (FUSS et al. 1996). Sie sind für die zellvermittelte Immunantwort gegenüber intrazellulären Pathogenen zuständig (NURIEVA u. CHUNG 2010).

Bei Allergien vom Soforttyp und bei Asthma wird durch IL-4 STAT6 aktiviert und die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3 und somit die Bildung von TH2-Zellen aus naiven Vorläuferzellen angeregt (HUANG u. CHEN 2016). Diese produzieren daraufhin IL-4, IL-5, IL-13 und IL-10 (STROBER u. FUSS 2011). Neben der allergischen Reaktion sind TH2-Zellen für die humorale Immunantwort und die Abwehr von Parasiten verantwortlich (NURIEVA u. CHUNG 2010).

TH17-Zellen

Durch IL-6 und IL-23 und die folgende Aktivierung von STAT3 wird die Bildung von TH17-Zellen induziert. Diese sind durch den Transkriptionsfaktor ROR γ t gekennzeichnet (NEURATH 2014). Sie produzieren IL-17, IL-17F und IL-22 und spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr extrazellulärer Pathogene (v.a. Pilze und Bakterien) (IVANOV et al. 2009). Des Weiteren wurde gezeigt, dass TH17-Zellen ebenfalls über ein inflammatorisches Potential verfügen und bei Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielen (AUJLA et al. 2007).

Regulatorische T-Zellen (Treg)

Regulatorische T-Zellen tragen durch die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF β zur Unterdrückung von Effektor T-Zellen bei und verhindern das Entstehen einer Autoimmunität oder immunbedingten Entzündungen. Als wichtigster Marker zur Identifikation dieses Zelltyps gilt die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (CHAUDHRY et al. 2011). Man unterscheidet die Subpopulationen der natürlichen

regulatorischen T-Zellen (nTreg), die für die Selbsttoleranz verantwortlich sind, und die sich im Verlauf einer Immunreaktion entwickelnden induzierbaren regulatorischen T-Zellen (iTreg). Tregs regulieren die Immunreaktion und sind dafür zuständig Reaktionen des Immunsystems zuzulassen, andererseits werden durch TGF β und IL-10 überschießende Reaktionen verhindert (WORKMAN et al. 2009). Des Weiteren sind sie wesentlich an der Ausbildung der oralen Toleranz beteiligt (ZHANG et al. 2001).

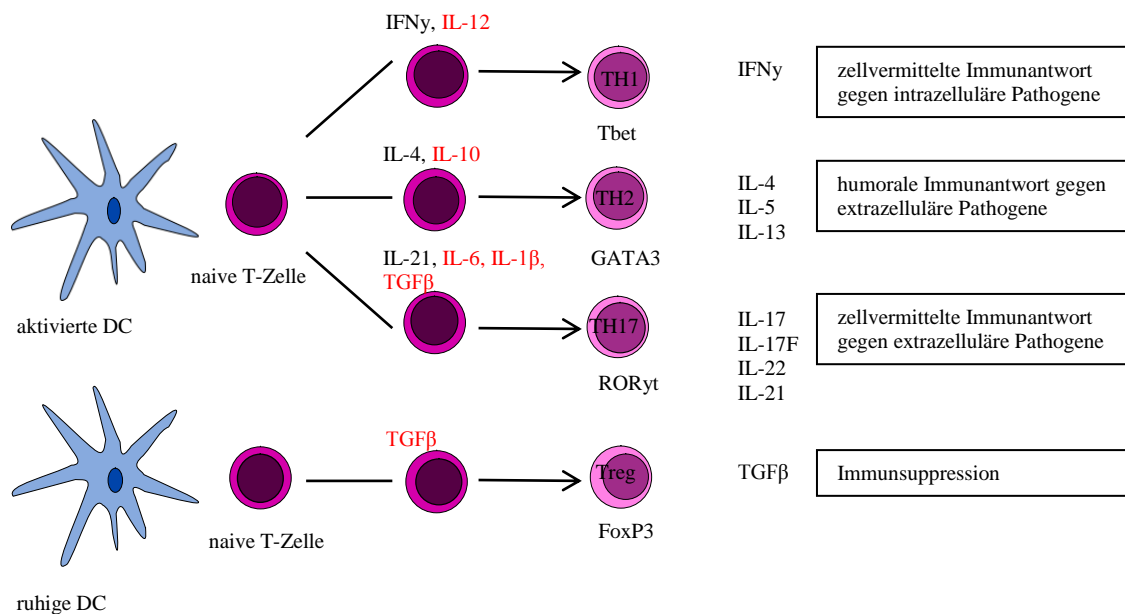


Abbildung 5: Übersicht der T-Zelldifferenzierung (modifiziert nach NURIEVA u. CHUNG 2010). Naive T-Zellen werden durch Antigenkontakt durch antigenpräsentierende Zellen aktiviert und zur Differenzierung angeregt. Durch die Zytokine IFN γ und IL12 werden die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT4 angeregt. Dies führt zu einer Expression des für TH1-Zellen typischen Transkriptionsfaktor Tbet. IL4 und IL10 aktivieren STAT6, sodass es zur Bildung des für TH2-Zellen charakteristischen GATA3 kommt. Nach Aktivierung durch IL-21, IL-6, IL-1 β und TGF β wird über STAT3 ROR γ t auf TH17-Zellen exprimiert. Unter Einfluss von TGF β differenzieren naive T-Zellen nach der Aktivierung von STAT5 zu regulatorischen T-Zellen, die den Transkriptionsfaktor FoxP3 tragen. In rot dargestellt: von DC sezerniert, in schwarz dargestellt: von naiven T-Zellen sezerniert; IFN γ =Interferon γ ; IL=Interleukin; STAT=signal transducer and activator of transcription; TGF β =transforming growth factor β ; Tbet, GATA3, ROR γ t =Transkriptionsfaktoren

2.3.3. Zytokine und Chemokine

Die Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen und somit die Steuerung des Immunsystems erfolgt über spezifische Signalbotenstoffe. Zytokine nehmen in diesem Regulationsprozess eine besondere Stellung ein, da sie sowohl pro-inflammatorische als auch anti-inflammatorische Wirkungen haben können (TURNER et al. 2014).

Chemokine sind eine Gruppe von Zytokinen, die für die Migration von Effektorzellen an den Entzündungsort verantwortlich sind (ROT u. VON ANDRIAN 2004).

TARC

Das thymusaktivitätsregulierte Zytokin (TARC), oder auch CCL17, gehört in die Gruppe der Chemokine. Es wird von dendritischen Zellen des Thymus, Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten sezerniert (SAEKI u. TAMAKI 2006). TARC spielt zunächst für die Entwicklung der T-Zellen im Thymus eine wichtige Rolle. Des Weiteren bindet es mittels des CCR4-Rezeptors ausschließlich an T-Zellen und beeinflusst so deren Fortbewegung (IMAI et al. 1997). In einem Modell mit Ccl17^{E/E}-Mäusen konnte gezeigt werden, dass bei fehlender CCL17 Sekretion durch *Dextran Sodium Sulfat* (DSS) oder T-Zell-Transfer keine Kolitis-Symptome ausgelöst werden konnten. CCL17 fördert die Bildung inflammatorischer Zytokine, sowie TH1 und TH17 Zellen. Regulatorische T-Zellen hingegen werden unterdrückt (HEISEKE et al. 2012).

HGF

Hepatocyte growth factor (HGF) wird von mesenchymalen Stammzellen sezerniert und wirkt auf epitheliale und endotheliale Zellen (NAKAMURA u. MIZUNO 2010). Er beeinflusst die Proliferation der Epithelzellen sowie die Zellmigration und ist ein wichtiger Bestandteil des Wundheilungsprozesses (TAHARA et al. 2003). HGF verhindert Zellapoptosen und wirkt anti-inflammatorisch. Dies hat zur Folge, dass bei Organerkrankungen die HGF-Werte im Plasma erhöht sind (NAKAMURA u. MIZUNO 2010). In DSS-Rattenmodellen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit HGF zu einer verringerten epithelialen Schädigung, einem geringeren histologischen Score und einer rückläufigen Apoptoserate führt (OHDA et al. 2005). Im Tiermodell wird die klinische Symptomatik verbessert, jedoch konnten fulminante Krankheitsverläufe bisher nicht beeinflusst werden (ZWINTSCHER et al. 2016).

TGF β

Transforming growth factor β (TGF β) wird von B- und T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen produziert und hat Auswirkungen auf die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen. Es sind drei Isoformen bekannt (TGF β 1-3), wobei vor allem TGF β 1 in die immunologischen Vorgänge eingebunden ist (LETTERIO u. ROBERTS 1998). Die Wirkung von TGF β ist abhängig von dem Differenzierungsgrad der jeweiligen Zelle und von dem Zytokinmilieu (SPORN u. ROBERTS 1992). TGF β hemmt die Differenzierung und Proliferation autoreaktiver CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (LI, M. O. u. FLAVELL 2008). Die Ausbildung der peripheren Toleranz wird auch durch den positiven Effekt auf regulatorische T-Zellen aufrechterhalten (LI, M. O. et al. 2006). Die Stimulation naiver T-Zellen führt zu der Expression von FoxP3 und ROR γ t. Abhängig von dem Zytokinmilieu entwickeln sich unter dem Einfluss von TGF β regulatorische T-Zellen oder durch IL-6 TH17 Zellen (DILLER et al. 2016).

TNF α

Makrophagen werden durch IFN γ dazu angeregt Tumornekrosefaktor- α (TNF α) zu sezernieren (ELLERIN et al. 2003). TNF α spielt in der Pathogenese von CED eine wichtige Rolle. Durch die Aktivierung von Makrophagen, werden weitere inflammatorische Zytokine sezerniert. Weiterhin stimuliert TNF α Adhäsionsmoleküle, so dass die zelluläre Infiltration begünstigt wird. Die Durchlässigkeit des Epithels wird erhöht und somit die epitheliale Barriere weiter geschädigt. Weiterhin wirkt TNF α auf Fibroblasten, was über die Freisetzung von Metalloproteinasen zu Gewebeveränderungen führt. Sowohl bei *Colitis ulcerosa* als auch bei *Morbus Crohn*-Patienten konnten erhöhte TNF α -Werte und eine Verlagerung von NF κ B innerhalb der Zelle festgestellt werden (SANDS u. KAPLAN 2007). Über den Signalweg des Transkriptionsfaktor NF κ B werden ebenfalls Metalloproteinasen freigesetzt, die das Gewebe schädigen (LI, W. et al. 2010).

Eine mögliche Therapie bei Kolitis ist die Gabe des monoklonalen anti-TNF α -Antikörpers Infliximab (OLSEN et al. 2009)

TSLP

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) ist ein Zytokin, das von intestinalen Epithelzellen sezerniert wird (TAYLOR et al. 2009). TSLP wirkt über seinen Rezeptor TSLPR auf CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, NKT-Zellen, B-Zellen, das Epithel und auf Eosinophile, Basophile und Mastzellen (ROAN et al. 2012). Durch TSLP aktivierte dendritische Zellen exprimieren

OX40L und unterstützen die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu TH2-Zellen. Diese TH2-Zellen produzieren die typischen Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13) mit Ausnahme von IL-10 (SOUMELIS et al. 2002). Durch die Wirkung der TH2-Zytokine auf Mastzellen, Eosinophile, Basophile und B-Zellen wird die Bedeutung von TSLP bei allergischen Reaktionen deutlich (ITO et al. 2012). TSLP ist aber auch für die Aufrechterhaltung der Homöostase und die Ausbildung eines nicht-entzündlichen Phänotyps der dendritischen Zellen nötig. Im Gegensatz dazu konnte eine verringerte TSLP-Produktion mit Morbus Crohn in Zusammenhang gebracht werden (RIMOLDI et al. 2005).

2.3.4. Autoimmunität

Das Immunsystem ist normalerweise auf die Abwehr körperfremder pathogener Erreger eingestellt. T- und B-Zellen lernen im Laufe ihrer Entwicklung zwischen *self* und *non-self* zu unterscheiden. Im Thymus und im Knochenmark kommt es zur Ausbildung der zentralen Toleranz. Zellen, die nur an MHC-Moleküle binden, körpereigene Moleküle aber nicht erkennen, werden nicht ausselektiert (SUZUKI et al. 2001). Entgehen autoreaktive Zellen diesen zentralen Kontrollmechanismen, können sie in der Peripherie mittels klonaler Zerstörung und dem Ausbleiben einer Immunreaktion unschädlich gemacht werden (WEBB et al. 1990).

Warum es in manchen Fällen zur Ausbildung einer Autoimmunität, einer Reaktion gegen körpereigene Antigene, kommt, ist unklar. Es wird vermutet, dass genetische Faktoren genauso wie Umweltfaktoren und eine fehlerhafte Regulation der Immunantwort durch regulatorische T-Zellen eine Rolle spielen (ROSENBLUM et al. 2015). Daraufhin bilden sich Autoantikörper, die gegen körpereigene Antigene (Autoantigene) gerichtet sind, und autoreaktive T-Zellen.

Auch wenn die genaue Ätiologie von *Colitis ulcerosa* noch nicht vollständig geklärt werden konnte, gibt es immer neue Ansätze, um das Verständnis der Krankheit zu verbessern. In Kolonproben von Kolitis-Patienten können im Vergleich zu Gesunden beispielsweise vermehrt CD8⁺ zytotoxische T-Zellen nachgewiesen werden (FOHLINGER et al. 2016). CD8⁺ Effektorzellen scheinen bei der Entstehung von zellvermittelten, gewebespezifischen Autoimmunerkrankungen wie multipler Sklerose und Diabetes Typ I von Bedeutung zu sein (GRAVANO u. HOYER 2013).

Autoantikörper wie anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) und Antikörper gegen Pankreaszellen (PAB) wurden ebenfalls in Kolitis-Patienten identifiziert. Je nach

Färbeverhalten unterscheidet man zytoplasmatische ANCA (cANCA) und perinukleäre ANCA (pANCA) (MITSUYAMA et al. 2016). Hierbei sind vor allem gegen das antimikrobiell wirkende Enzym Proteinase 3 (Pr3) gerichtete ANCA interessant (MAHLER et al. 2013).

2.4. Tiermodelle

Um das Verständnis der Pathogenese von *Colitis ulcerosa* zu verbessern, haben sich Mausmodelle über die letzten Jahre kontinuierlich weiterentwickelt und sind für die Kolitis-Forschung unabdingbar geworden. Sowohl chemisch-induzierte oder auch über bakterielle Infektionen ausgelöste Kolitis- und transgene Modelle ermöglichen es, pathophysiologische Abläufe zu untersuchen oder Therapeutika zu testen (LOW et al. 2013).

DSS-Kolitis

Dextran Sodium Sulfat (DSS) schädigt das Epithel und führt dazu, dass luminale Antigene in der *Lamina propria* eine Entzündung hervorrufen. In Abhängigkeit von der DSS-Konzentration und der Häufigkeit der Verabreichung über das Trinkwasser lässt sich das Modell leicht modulieren und spiegelt sowohl akute als auch chronische Krankheitsverläufe wider (CHASSAING et al. 2014). Die typischen Kolitis-Symptome beginnen ab Tag 3 und sind am stärksten an Tag 7 ausgeprägt (YAN et al. 2009). Jedoch ist das Modell abhängig von Faktoren wie Haltungsbedingungen, Mausstamm und Geschlecht der Mäuse sehr variabel in der Ausprägung der Symptome (LOW et al. 2013).

Oxazolon-Kolitis

Das Hapten Oxazolon wird in Ethanol gelöst und nach topischer Sensitivierung rektal verabreicht. Oxazolon und Oxazolon-modifizierte bakterielle Antigene gelangen in die *Lamina propria* und lösen eine Immunantwort und einen Krankheitsverlauf aus, der dem Bild der Kolitis im Menschen sehr ähnelt. Charakteristischerweise wird eine durch NK-T-Zellen vermittelte TH2-Immunantwort (IL-4, IL-5, IL-13) hervorgerufen, begleitet von Symptomen wie Durchfall, Gewichtsverlust, Ulzerationen, Becherzellerverlust und einer hohen Sterblichkeitsrate (BOIRIVANT et al. 1998). Mit einem IL-4 Antikörper kann der Krankheitsverlauf bis hin zur Besserung beeinflusst werden, so dass dieses Modell geeignet ist, um die Bedeutung der TH2-vermittelten Immunantwort genauer zu untersuchen (HELLER et al. 2002).

Ähnlich wie Oxazolone ist auch TNBS ein Hapten. Im Gegensatz zu Oxazolone wird eine TH1-Immunantwort hervorgerufen, so dass die durch TNBS hervorgerufene Reaktion *Morbus Crohn* ähnelt (HELLER et al. 2002).

Salmonellen-induzierte Kolitis

Werden Mäuse nach antibiotischer Vorbehandlung oral mit *Salmonella Typhimurium* infiziert, kommt es zu einer intestinalen Entzündung, die mit Kryptverlust, Erosionen und Infiltration durch neutrophile Granulozyten einhergeht. Nach 5-7 Tagen entsteht jedoch einer systemischen Infektion, so dass dieses Modell nur geeignet ist, um die akute Phase der Erkrankung zu untersuchen (LOW et al. 2013).

Weitere Modelle in der Kolitis-Forschung basieren auf Mauslinien mit genetischen Modifikationen, die es ermöglichen, den Effekt bestimmter Gene auf die Erkrankung genauer zu untersuchen (MIZOGUCHI et al. 2016).

Ethanol-induzierte Kolitis

Mit humanen PBMC rekonstituierte NOD-scid IL2R γ -chain^{null}-Mäuse entwickeln nach der rektalen Applikation von 50% Ethanol Symptome einer Kolitis (PALAMIDES et al. 2016). In früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe wurde in Ethanol gelöstes Oxazolone verwendet, um die Kolitis auszulösen. Dabei stellte sich heraus, dass die ebenfalls mit Ethanol behandelte Kontrollgruppe mildere Kolitissymptome entwickelte. Zusätzlich war die Sterblichkeitsrate geringer (NOLTE et al. 2013).

2.5. NOD-scid IL2R γ -chain^{null}-Mäuse

Die Untersuchung biologischer Abläufe im Menschen erfordert oftmals den Einsatz von Tiermodellen an nichtmenschlichen Primaten. Ethische Aspekte und auch technische Herausforderungen führen dazu, dass man schnell an die Grenzen des Möglichen stößt. Die Entwicklung humanisierter Tiermodelle vereinfacht die Analyse der menschlichen Biologie deutlich. Durch die Transplantation humaner hämatopoetischer Stammzellen oder mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) entwickeln immundefiziente Mäuse ein chimäres Immunsystem, das stark durch menschliche Immunzellen geprägt ist (SHULTZ et al. 2007).

Erstmals wurde 1966 die fehlerhafte Thymusentwicklung in Nacktmäusen beschrieben (FLANAGAN 1966). Die Entdeckung der Prkd^{scid}-Mutation (*Protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide; severe combined immunodeficiency*) der CB17-Mäuse 1983 zeigte, dass diese Mäuse durch einen Mangel an B- und T-Lymphozyten keine humorale oder zellvermittelte Immunität ausbilden können (BOSMA u. CARROLL 1991).

Die Entwicklung der immundefizienten *non-obese diabetic* (NOD)-scid-Mäuse resultierte in einer höheren Rekonstitutionsrate durch PBMC (HESSELTON et al. 1995). Darüberhinaus konnte auch eine verringerte NK-Zellaktivität gegenüber den CB17-scid-Mäusen nachgewiesen werden (SHULTZ et al. 1995).

Homozygote Mäuse, die eine Mutation des *Genlocus* der Interleukin-2 Rezeptor (IL-2R) γ -Kette tragen, haben eine gestörte B- und T-Zellentwicklung und keine NK-Zellen. Die IL-2R γ -Kette ist ausschlaggebend für die Signalwege der Rezeptoren IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 (SUGAMURA et al. 1996). Mäuse mit dieser Mutation wurden bereits 1995 entwickelt. Die Weiterentwicklung zu IL2R γ -chain^{null} führte zu einer Humanisierung des Immunsystems der Mäuse nach der Übertragung menschlicher Zellen (SHULTZ et al. 2007).

3 Fragestellung und Ziele

3.1. Fragestellung

In der Literatur sind mit ANCA und PAB Autoantikörper in Kolitis-Patienten beschrieben (MAHLER et al. 2013). CD99 ist ein weiteres Autoantigen, das in *Colitis ulcerosa*-Patienten, aber nicht in Gesunden nachgewiesen werden konnte (Daten noch nicht veröffentlicht). Die Identifikation von Autoantikörper in Patienten lässt die Beteiligung eines autoimmunen Prozesses, der zu einem allgemeinen Toleranzverlust führt, vermuten. Ob und wie Autoantigene auf das Entzündungsgeschehen wirken, ist noch unklar.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit das Krankheitsgeschehen durch die Applikation von Autoantigenen beeinflusst werden kann. Zunächst wurde die Wirkung der Antigene Pr3 und CD99 auf die Immunzellen *in vitro* analysiert. Hierfür wurde die Aktivierung der T-Zellen, die TH-Unterguppen, regulatorische T-Zellen sowie Monozyten und Makrophagen genauer betrachtet.

Im nächsten Schritt erfolgte die Untersuchung der Antigeneffekte an Mäusen mit einem humanisierten Immunsystem. Hierfür wurden NOD-scid IL2Ry-chain^{null} Mäusen mit PBMC von Kolitis-Patienten rekonstituiert, die Antikörper gegen Pr3 und CD99 aufwiesen. Zur Auslösung der Kolutissymptome in der Maus wurden vor der intraperitonealen Gabe der Antigene zunächst 30 % Ethanol rektal appliziert. Um die möglichen Effekte der Antigene auf die Immunzellen von Effekten des Alkohols differenzieren zu können, erhielt eine Gruppe Ethanol, eine Gruppe Ethanol + Pr3 und eine Gruppe Ethanol + CD99. Nachfolgend wurde die klinische Aktivität der Versuchsgruppen und das immunologische Profil von Zellen in der Milz und im Kolon mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Um zu analysieren, inwiefern die Kolutissymptome und das immunologische Bild durch Therapeutika beeinflusst werden, die auf regulatorische Zellen wirken, wurde der mTOR Inhibitor Sirolimus verabreicht. Sirolimus fördert die Proliferation regulatorischer T-Zellen (BATTAGLIA et al. 2012). Vor diesem Hintergrund sollten die klinische Aktivität und die Wirkung auf die Immunzellen in der Milz und im Kolon betrachtet werden.

3.2. Ziele

Ziel I: Identifizierung möglicher krankheitsrelevanter Autoantigene in Kolitis-Patienten, die Rückschlüsse auf einen autoimmunen Prozess erlauben.

Hypothese 1: Wir vermuten, dass Autoimmunität den Entzündungsprozess bei *Colitis ulcerosa* beeinflusst.

Ziel II: Verständnis der immunologischen Vorgänge vor dem Hintergrund der Autoimmunität *in vitro*.

Hypothese 2: Bei Kolitis-Patienten liegen im Vergleich zu gesunden Spendern erhöhte CD99 und pANCA Titer vor. Wir nehmen an, dass diese beiden Antigene einen Effekt auf die T-Zell-Aktivierung sowie auf regulatorische T-Zellen, Makrophagen und Monozyten haben. Dazu inkubieren wir isolierte PBMC in Zellkultur und führen eine vergleichende FACS-Analyse durch.

Ziel III: Validierung der *in vitro* generierten Ergebnisse im NSG-Mausmodell durch die Gabe von Pr3 und CD99 nach der rektalen Applikation von 30 % Ethanol.

Hypothese 3.1: Die rektale Applikation von 30 % Ethanol und Pr3 und CD99 i.p. führt zu einer veränderten klinischen Aktivität im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle und der mit 30 % Ethanol behandelten Gruppe.

Methode 3.1: Vergleich des klinischen, makroskopischen und histologischen Scores der Ethanol + Pr3-Gruppe, der Ethanol + CD99-Gruppe, der unbehandelten Kontrollgruppe und der Ethanolgruppe.

Hypothese 3.2: Die Applikation der Antigene führt zu einer Aktivierung der T-Zellen sowie zu einer Beeinflussung der regulatorischen Zellen, Monozyten und Makrophagen.

Methode 3.2: Vergleichende FACS-Analyse aus der Milz und dem Darm zwischen der Ethanol + Pr3-Gruppe, der Ethanol + CD99-Gruppe, der unbehandelten Kontrollgruppe und der Ethanolgruppe.

Ziel IV: Effekt ausgewählter Immunmodulatoren auf die immunologischen Vorgänge im NSG-Mausmodell.

Hypothese 4.1: Die Gabe des mTOR-Inhibitors Sirolimus führt zu einem geänderten klinischen, makroskopischen und histologischen Score im Vergleich zu der mit Ethanol behandelten Gruppe.

Methode 4.1: Vergleich des klinischen, makroskopischen und histologischen Scores der Ethanol + Sirolimusgruppe, der unbehandelten Kontrolle und der Ethanolgruppe.

Hypothese 4.2: Durch die Applikation von Sirolimus wird das immunologische Gleichgewicht in der NSG-Maus zugunsten regulatorischer T-Zellen verschoben.

Methode 4.2: FACS-Analyse aus Milz und Darm in Hinblick auf die T-Zellen, regulatorischen T-Zellen, Monozyten und Makrophagen.

Hypothese 4.3: Durch die Gabe von Sirolimus wird die Expression anti-inflammatorischer Zytokine beeinflusst.

Methode 4.3: Untersuchung der Expression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine mittels qRT-PCR.

Hypothese 4.4: Die Beeinflussung des immunologischen Profils durch Sirolimus in der NSG-Maus ist abhängig von der Krankheitsaktivität des PBMC-Spenders.

Methode 4.4: Vergleichende FACS-Analyse aus Milz und Darm der Ethanol + Sirolimusgruppe, der unbehandelten Kontrolle und der Ethanolgruppe der Versuche UC 103, UC 105 und UC 118.

4 Material und Methoden

4.1. Spenderrekrutierung

Die Rekrutierung der Spender erfolgte in der Sprechstunde der CED-Ambulanz von PD Dr. Florian Beigel.

Basierend auf dem Ethikvotum der LMU München erfolgte die Entnahme von 60 ml Blut nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten.

Für die Rekonstitution der Mäuse wurden Spender gewählt, die Antikörper gegen Pr3 beziehungsweise CD99 aufwiesen.

4.2. Versuchstiere

Die Tierversuche wurden durch die Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 55.2-2-1-54-2532-74-15 genehmigt und in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt. Für alle Untersuchungen wurden Mäuse des Stammes NOD-scid IL2R γ -chain^{null} verwendet.

Die Haltung der Mäuse erfolgte in der Zentralen Versuchstierhaltung der Chirurgischen Klinik der LMU München, Nussbaumstraße 20, 80336 München. Die Tiere wurden in individuell belüfteten Käfigen unter optimierten Haltungsbedingungen (OHB) gehalten, deren Hygienestandard dem einer SPF-Haltung ähnelt und nach Empfehlungen der Felasa überwacht wird.

4.3. Isolierung humaner PBMC

Für die Isolierung der für die Rekonstitution der Mäuse benötigten PBMC wurden den Spendern 60 ml Blut in S-Monovetten entnommen. Das Blut wurde im Verhältnis 1:2 mit Hanks Buffered Saline (HBSS) gemischt und jeweils 30 ml in ein Leukosep-Röhrchen überführt. Die Leukosep-Röhrchen wurden zuvor mit 15 ml Roti©-Sep 1077 beladen. Im Anschluss wurden die Proben 30 Minuten bei 400 g und langsam zunehmender Beschleunigung sowie langsamer Reduktion der Geschwindigkeit zentrifugiert. Die entstandene Interphase wurde abgenommen und in ein 50 ml Falcon überführt. 30 μ l der Zelllösung wurden 1:1 in Trypanblau resuspendiert und zur Ermittlung der Zellzahl in eine Neubauer-Zählkammer geladen. Die Konzentration wurde auf 4×10^6 Zellen pro 100 μ l PBS eingestellt. Die restlichen Zellen wurden verdünnt und jeweils 100 μ l mit 100 μ l FACS-Mastermix inkubiert und gefärbt.

4.4. Rekonstitution

Rekonstituiert wurden 6-8 Wochen alte NOD-scid IL2Ry-chain^{null} Mäuse aus eigener Nachzucht. Es wurden regelmäßig neue Zuchtpaare von Charles River Laboratories bezogen. Die Mäuse wurden in einem Restraîner fixiert und der Schwanz bis zum Hervortreten der *Vena caudalis dorsalis* und *mediana* für 1 Minuten mit einer Infrarotlampe erwärmt. Pro Maus wurden 4×10^6 Zellen pro 100 μ l PBS intravenös mit einer 1 ml Insulin-BD Mikro-fine 0,33 mm (29G)*12,7 mm Spritze injiziert.

4.5. Versuchsablauf

4.5.1. Tierzahlen und Versuchsgruppen

Insgesamt wurden 76 NOD-scid IL2Ry-chain^{null} Mäuse mit dem Blut von fünf verschiedenen Spendern rekonstituiert, davon stellten 20 Tiere die unbehandelte Kontrollgruppe dar. 26 Tiere dienten als Ethanolkontrolle. Zusätzlich zur Ethanolapplikation erhielten 4 Tiere das Antigen Pr3, 8 Tiere das Antigen CD99 und 18 Tiere den mTor-Inhibitor Sirolimus (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht der Anzahl der verwendeten Tiere pro Gruppe. In Klammern sind vor dem Versuchsende getötete bzw. verendete Tiere angegeben.

Spender	Kontrolle	Ethanol	Pr3	CD99	Sirolimus	Gesamt
UC 102	4	4	-	4	-	12
UC104	4	4	4	4	-	16
UC 103	4	6 (1)	-	-	6	16
UC 105	4	6	-	-	6 (1)	16
UC 118	4	6	-	-	6	16
Summe	20	26	4	8	18	76

Wie zuvor erfolgte die Rekonstitution der Mäuse der Versuche UC 103, UC 105 und UC 118 an Tag 1 und die Sensitivierung mit 10 % Ethanol an Tag 8. An den Tagen 15 und 18 wurde den Mäusen 50 % Ethanol appliziert. Die Sirolimusapplikation erfolgte an den Tagen 7, 8 und 14-20 gegeben. Die klinische Aktivität wurde bis zum Versuchsende an Tag 21 bewertet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Behandlungsprotokoll der Versuche UC 103, UC 105 und UC 118

Tag	1	7	8	9	10	12	14	15	16	17	18	19	20	21
Rekonstitution	x													
10 % EtOH			x											
50 % EtOH								x			x			
Klin. Score	x		x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Sirolimus		x		x			x	x	x	x	x	x	x	
Versuchsende														x

4.5.3. Ethanol-, Antigen- und Medikamentenapplikation

An Tag 8 erfolgte die Sensitivierung durch die 10 % Ethanolapplikation. Bei den Versuchen UC 102 und 104 erfolgte an den Tagen 15, 20 und 25 die 30 % Ethanolapplikation, bei den Versuchen UC 103, UC 105 und UC 118 erfolgte die 50 % Ethanolapplikation an den Tagen 15 und 18. Hierfür wurden die Mäuse mittels einer Inhalationsnarkose mit 4 % Isofluran bei einer Sauerstoffflussrate von 4 l/min in Narkose gelegt. Mittels eines 1 mm Katzenkatheters, der mit 2 % Xylocain-Gel gleitfähig gemacht wurde, wurden jeweils 150 µl Ethanol appliziert. Um ein Herauslaufen des Alkohols zu verhindern, wurden die Mäuse im Anschluss kurz hochgelagert.

Pro Applikation an den Tagen 15, 20 und 25 erhielten die Mäuse der Versuche UC 102 und UC 104 200 µl der Antigene (Pr3 bzw. CD99) gelöst in PBS mit einer Konzentration von 10 µg/ml.

Die Sirolimusgruppe der Versuche UC 103, UC 105 und UC 118 erhielt 1,5 mg/kg Rapamune gelöst in 200 µl PBS an den Tagen 7, 8, 14-20.

Alle Antigen- und Medikamentenapplikationen erfolgten intraperitoneal mit einer 1 ml Insulin-BD Mikro-fine 0,33 mm (29G)*12,7 mm Spritze.

4.5.4. Klinischer Aktivitätsscore

Der klinische Aktivitätsscore wurde an 12 Tagen (UC 103, 105, 118) beziehungsweise an 19 Tagen (UC 102, 104) anhand der Parameter Gewicht, Verhalten, Körperhaltung und Kotkonsistenz bewertet. Für jeden Parameter wurden Abbruchkriterien festgelegt. Zusätzlich wurde ein Tagesscore von 7 als hochgradige Belastung eingestuft und führte zu dem Abbruch des Versuchs, ebenso wie ein Score >5 über 72 Stunden. Die Punkte der einzelnen Kriterien wurden summiert (Tabelle 6).

Tabelle 6: Bewertung der klinischen Aktivität.

Kriterium	Bewertung	Punkte	Abbruchkriterium
Gewicht	Kein Gewichtsverlust	0	
	0-5 %	1	
	5-10 %	2	
	10-15 %	3	
	15-20 %	4	
	>20 %	5	x
Verhalten	lebhaft	0	
	ruhig	1	
	struppiges Fell	1	
	Apathie/Selbstisolation	5	x
Körperhaltung	Normal	0	
	Intermittierende Buckelhaltung	1	
	Permanente Buckelhaltung	4	x
Kotkonsistenz	Geformt	0	
	Breiig	1	
	Flüssig	2	
	Flüssig blutig	4	x

4.5.5. Makroskopische Bewertung des Kolons

Bei der makroskopischen Betrachtung des Kolons wurden die Kotkonsistenz, die Länge, Dilatation, hyperämische Bereiche und Nekrosen bewertet. Die Punkte der einzelnen Kriterien wurden summiert (Tabelle 7).

Tabelle 7: Makroskopische Bewertung des Kolons

Kriterium	Bewertung	Punkte
Kotkonsistenz	geformt	0
	ungeformt/breiig (<0,5cm)	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

4.6. Analysen

4.6.1. Versuchsende

An Tag 21 wurden die Mäuse mit einer Ketamin/Xylazinlösung (2 mg Ketamin und 0,4 mg Xylazin) narkotisiert. Nach Überprüfen des chirurgischen Toleranzstadiums wurden die Mäuse entblutet und mittels zervikaler Dislokation getötet. Milz und Kolon wurden für die weitere Verarbeitung entnommen. Die Milz wurde über einem 70 µm Zellsieb homogenisiert und mit 10 ml PBS gewaschen. Nach einer Zentrifugation bei 1400 g für 5 Minuten wurde das Zellpellet in FACS-Puffer resuspendiert und die Zellen für die FACS-Analyse gefärbt.

Für die Histologie wurde ein 1 cm großes Stück Kolon entnommen und 24 Stunden in 4 % Formaldehyd gelagert, bevor es in 70 % Ethanol überführt wurde.

Für die RNA-Analyse wurde circa 1 cm des Kolons klein geschnitten und in 500 µl RNAlater gegeben. Die Proben wurden 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert und dann bei -20°C tiefgefroren.

Isolierung von humanen *Lamina propria*-Zellen aus dem Kolon der Maus

Das restliche Kolon wurde für die Isolierung humaner *Lamina propria*-Zellen verwendet. Hierfür wurde es längs aufgeschnitten, der Kot entfernt, in PBS gewaschen und danach sehr klein geschnitten. Es folgte ein Aufschluss der Epithelzellen und ein enzymatischer Verdau des Gewebes (modifiziertes Protokoll nach WEIGMANN et al. 2007). Die Proben jeder Gruppe wurden gepoolt und zunächst in einer Vorverdaulösung 20 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad mit Schüttelfunktion inkubiert. Nach der Filtration über ein 70 µm Zellsieb und einem Waschschrift mit 10 ml PBS, folgten zwei enzymatische Verdauenschritte für 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Anschließend erfolgte ein erneutes Filtern über ein 70 µm Zellsieb. Nach einer Zentrifugation bei 1400 g für 5 Minuten wurde das Zellpellet in FACS-Puffer resuspendiert und die Zellen für die FACS-Analyse gefärbt.

4.6.2. FACS-Analyse

Färbung

Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurden mit 100 µl der Antikörperlösung lichtgeschützt für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden im Anschluss mit 300 µl FACS-Puffer gewaschen und bei 1400 g für 5 Minuten zentrifugiert und in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Stainings mit Sekundärantikörper wurden für weitere 20 Minuten inkubiert.

Gating

Durch die Parameter FSC und SSC wurde die Leukozytenpopulation festgelegt.

Für die Bestimmung des Rekonstitutionsgrades wurden die Marker für humane CD45 (hCD45) und murine CD45 (mCD45) Zellen verwendet. Der prozentuale Anteil spiegelt den Anteil an der Gesamtleukozytenpopulation wider.

Mithilfe der Parameter FSC und CD4 wurden zunächst die CD4⁺ T-Zellen bestimmt. Die aktivierten T-Zellen wurden als CD4⁺CD69⁺, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD103⁺ und CD4⁺CD134⁺ definiert.

Um weitere T-Zell-Untergruppen zu unterscheiden, wurden die CD4⁺ Helferzellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen angefärbt. CD4⁺CCR4⁺ Zellen wurden als regulatorische T-Zellen angesehen. CD4⁺CCR4⁺CCR6⁺ Zellen wurden als TH17-Zellen definiert.

Makrophagen wurden in CD11b⁺ und CD11c⁺ eingeteilt. Zur weiteren Differenzierung wurden die Zellen mit Farbstoffen für die Marker CD1a, TSLPR, CD80/86 und E-Cadherin gefärbt.

Die Unterscheidung der Monozyten erfolgte zunächst in CD14⁺ und CD16⁺ Zellen. CD14⁺ Zellen wurden durch CD1a und TSLPR weiter differenziert. Des Weiteren wurden die CD14⁺ Zellen auf die Expression von CD163 und CD206 untersucht (Tabelle 8).

Tabelle 8: Marker der FACS-Analyse. Genauere Angaben zu den verwendeten Antikörpern sind im Anhang (Tabelle 11) dargestellt.

Marker	Definition
hCD45	gemeinsames Antigen der humanen Leukozyten
mCD45	gemeinsames Antigen der murinen Leukozyten
CD4 ⁺ CD69 ⁺	frühe T-Zellaktivierung
CD4 ⁺ CD25 ⁺	T-Zellaktivierung
CD4 ⁺ CD103 ⁺	T-Zellaktivierung
CD4 ⁺ CD134 ⁺	T-Zellaktivierung
CD4 ⁺ CCR4 ⁺	Treg
CD4 ⁺ CCR4 ⁺ CCR6 ⁺	TH17
CD11b ⁺ CD1a ⁺	CD1a exprimierende Makrophagen
CD11b ⁺ TSLPR ⁺	TSLPR exprimierende Makrophagen
CD11b ⁺ CD80/86 ⁺	Reifer Makrophage
CD11b ⁺ E-Cadherin ⁺	E-Cadherin exprimierende Makrophagen
CD14 ⁺ CD1a ⁺	CD1a exprimierende Monozyten
CD14 ⁺ TSLPR ⁺	TSLPR exprimierende Monozyten
CD14 ⁺ CD163 ⁺ CD206 ⁺	M2 Monozyten

4.6.3. Histologie

Für die Histologie wurde den Mäusen ein circa 1 cm langes Stück des Dickdarms entnommen und 24 Stunden in 4 % Formaldehyd aufbewahrt, bevor es in 70 % Alkohol überführt wurde. Innerhalb von sieben Tagen wurden die Proben mithilfe eines Histomaten verarbeitet. Hierfür wurde ein Programm gewählt, das die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe zunächst entwässerte. Zur Entfernung des Alkohols diente Xylol als Intermedium, so dass die Proben abschließend mit Paraffin durchtränkt werden konnten.

Nach Programmende wurden die Proben sofort mittels einer Tissue-Tek®TECTM-Ausgießkonsole in Paraffin eingebettet.

Die Paraffinblöcke wurden mithilfe eines Schlittenmikrotoms auf eine Dicke von 3µm geschnitten und auf Menzel-Gläser SuperFrost®Plus aufgezogen.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Schnitte mit Xylol zunächst 2x10 Minuten entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe, bestehend aus 100 %, 96 % und 70 % Alkohol, für jeweils 2x5 Minuten rehydriert. Nach dem Spülen in Aqua dest. wurden die Schnitte für die basische Kernfärbung 4 Minuten mit Hämalaun gefärbt und 10 Minuten unter laufendem Leitungswasser gebläut. Die regressive Färbung erfolgte für 4 Minuten mit dem sauren Zytoplasmafarbstoff Eosin. Abschließend wurden die Schnitte durch kurzes Spülen in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 80 %, 96 % und 100 % Alkohol dehydriert und für 2x5 Minuten mit Xylol fixiert.

Die noch feuchten Schnitte wurden mit Malinol bedeckt und mit 24x60 mm Deckgläschen abgedeckt.

Histologischer Score

Der histologische Score wurde anhand der in Tabelle 9 aufgeführten Kriterien erhoben. Pro Maus wurden drei Schnitte von drei verschiedenen Stellen betrachtet.

Tabelle 9: Histologischer Score

Kriterium	Bewertung	Punktzahl
Epithelerosionen	fokal	1
	generalisiert	2
	Basalmembran	3
Entzündungsinfiltrat	geringgradig	1
	mittelgradig	2
	hochgradig	3
	Infiltration der Muskularis	4
Atrophie/Fibrose	fokal	1
	generalisiert	2
Ödem	vorhanden	1
Einblutungen	vorhanden	1
	generalisiert	2

4.6.4. PCR

Für die quantitative real time PCR-Analyse wurde bei Versuchsende circa 1 cm des Kolons entnommen. Um einer RNA-Degradierung vorzubeugen, wurden die Proben in 500 µl RNAlater zunächst 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert und dann bei -20°C eingefroren.

RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde basierend auf dem Protokoll des RNeasy Plus Universal Mini Kit isoliert. Dazu wurden die Proben auf Eis aufgetaut und nach Entfernung des RNAlater Reagenten in 2 ml RNase-freie Mikrozentrifugenröhrchen mit jeweils einer Stahlkugel überführt, welche zuvor 15 Minuten auf Trockeneis gelagert wurden. Nach weiteren 15 Minuten auf Trockeneis erfolgte der mechanische Gewebeaufschluss mittels eines TissueLyser LT für 2 Minuten bei 50 Hz.

Mithilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion erfolgte eine Trennung von Proteinen, DNA und RNA. Hierfür wurden den Proben zunächst 900 µl des Phenol enthaltenden QIAzol Lysis Reagent beigelegt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lysate wurden in neue Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert. Daraufhin wurden 100 µl gDNA Eliminator solution, zur Entfernung genomischer DNA, und 180 µl Chloroform hinzugefügt.

Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben 15 Minuten bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Die entstandenen drei Phasen setzten sich wie folgt zusammen: Eine obere, wässrige Phase, die das RNA-Eluat enthielt, eine weiße zum Großteil aus DNA bestehende Interphase und eine untere organische Phase, die Phenol und Chloroform enthielt.

Die in der oberen Phase gelöste RNA wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt, mit 70 % Ethanol gefällt und anschließend mit im Kit enthaltenen Puffern über einer Säule gereinigt und in 60 µl RNase freiem Wasser gelöst.

cDNA-Synthese

Die cDNA wurde analog des Protokolls des QuantiNova Reverse Transcription Kit hergestellt. Für die Synthese wurden 5 µg der Gesamt-RNA verwendet. Es wurde ein Mastermix bestehend aus RNase freiem Wasser gDNA Removal Mix, QuantiNova Internal Control RNA QuantiNova Reverse Transcription Enzyme und QuantiNova Reverse Transcription Mix angesetzt.

Das Reaktionsgemisch wurde in einem Mastercycler Gradient für 3 Minuten bei 25°C inkubiert, um das *annealing* zu ermöglichen. Die nachfolgenden 10 Minuten bei 45°C stellen

die eigentliche Reverse Transkription dar. Abschließend erfolgte die Inaktivierung der Reaktion für 5 Minuten bei 85°C.

Die Reinheit sowohl von RNA als auch von cDNA wurde spektralphotometrisch mit einem NanoDrop 2000 erfasst. Basierend auf den Messungen wurde die entsprechende Menge RNA für die cDNA-Synthese berechnet.

Quantitative real-time PCR

Ein Mastermix aus TaqMan Fast Advanced Master Mix, Single Tube Taqman Gene Expression Assays und RNase freiem Wasser wurde angesetzt. Je 19 µl Mastermix und 1 µl Probe wurden in 96-well Platten überführt. Für die PCR-Reaktion wurde ein Applied Biosystems StepOnePlus real-time PCR System genutzt. Entsprechend des Taqman Fast Advanced Master Mix Reaktionsprotokolls wurden die Proben hierfür zunächst für zwei Minuten bei 50 °C mit Uracil-N glykosylase (UNG) inkubiert. Daraufhin erfolgte für zwanzig Sekunden die Aktivierung der Polymerase bei 95°C. Die Denaturierung und Replikation der DNA-Stränge fand über 40 Zyklen jeweils eine Sekunde bei 95°C beziehungsweise zwanzig Sekunden bei 60°C statt.

Als *Primer* dienten die *housekeeping genes* GAPDH und GUSB. Weiterhin wurden HGF, IFN γ , murines TARC/CCL17 (mTARC) und murines TGF β (mTGF β) gemessen.

4.6.5. Zellkultur

Isolierte PBMC von *Colitis ulcerosa*-Patienten (n=3) und gesunden Spendern (n=2) wurden über 48 Stunden in einer Zellkultur inkubiert. Hierfür wurde die Zellzahl auf 1 Millionen Zellen pro Milliliter eingestellt und die isolierten Zellen in RPMI resuspendiert. In einer 24-well Platte wurden pro well 0,5 ml RPMI-Medium versetzt mit 10 % FCS und 1 % Streptavidin hinzugefügt. Um die T-Zellaktivierung durch Antigene zu untersuchen wurde den Proben Pr3 (10 µg/ml) und CD99 (10 µg/ml) zugegeben. Diese Antigene wurden gewählt, da Kolitis-Patienten oftmals Antikörper gegen Pr3 und CD99 aufweisen.

Die mitgeführten Kontrollen bestanden aus einer Negativkontrolle (isolierte Zellen und Medium) sowie einer Positivkontrolle (isolierte Zellen, Medium und 10 µg Phythämagglutinin/ml).

4.6.6. Immunprofilierung

50 Seren von Kolitis-Patienten und 16 Seren von nicht Kolitis-Patienten wurden mittels Protein Chip auf die Expression von Autoantikörpern untersucht. Die Analysen wurden am AIT in Wien unter der Leitung von Professor Weinhäusl durchgeführt.

Antikörper gegen Pr 3 wurden am Klinikum der Universität München mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bestimmt.

4.6.7. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software „R“ (<https://www.r-project.org>). Wurden zwei Gruppen miteinander verglichen wurde ein t-Test durchgeführt, beim Vergleich mehrerer Gruppen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA und ein Tukey HSD-Test durchgeführt. Es wurde von einem Konfidenzintervall von 95 % ausgegangen.

Statistische Signifikanzen wurden wie folgt festgelegt:

- * $p < 0,05 - 0,01$
- ** $p = 0,01 - 0,001$
- *** $p < 0,001$

5 Ergebnisse

5.1. Immunprofilierung

Um die These zu überprüfen, ob Autoimmunität bei der Erkrankung an *Colitis ulcerosa* eine Rolle spielt, wurden Seren von erkrankten Patienten und nicht an Kolitis erkrankten Patienten auf die Expression von Autoantikörpern getestet. Hierfür wurden 50 Proben der Kolitis-Patienten und 16 Proben der nicht an Kolitis erkrankten Patienten mittels Protein-Chip auf die Expression von 7390 Proteinen untersucht. Die Analyse erfolgte am AIT in Wien unter der Leitung von Professor Weinhäusl. Es konnte gezeigt werden, dass erkrankte Patienten gegenüber nicht Erkrankten signifikant höhere Werte von Antikörpern gegen CD99 aufwiesen (Daten auf Anfrage verfügbar).

Antikörper gegen Pr3 wurden am Klinikum der LMU München mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bestimmt.

5.2. Auswertung der Spender

Mithilfe des *simple clinical colitis activity index* (SCCAI) (WALMSLEY et al. 1998) wurde zu Versuchsbeginn die Krankheitsaktivität der Spender erfasst (Tabelle 10). Hierbei wurden Stuhlfrequenz, Stuhldrang, Blutbeimengungen, Allgemeinbefinden und extraintestinale Manifestationen beurteilt.

Für die Versuche UC 102, UC 103, UC 104 und UC 105 wurden Spender ausgewählt, die erhöhte Antikörpertiter gegen CD99 oder Pr3 aufwiesen.

Tab 10.: Spenderübersicht. Die Krankheitsaktivität wurde mittels des *simple clinical colitis activity index* (SCCAI) erfasst. Zusätzlich wurden Antikörper gegen CD99 bzw gegen Pr3 bestimmt. RFI entspricht dem Log2 der *median relative fluorescence intensity*.

Spender	SCCAI	Krankheitsdauer	Verlauf	Medikamente	Anti-CD99 [RFI]	Anti-Pr3 [U/ml]
102	3	16 Jahre	Chronisch-kontinuierlich	Salofalk, Ursofalk	11,45	
104	4	8 Jahre	Chronisch-rezidivierend	Salofalk, Remicade		60,6
103	5	17 Jahre	Chronisch-rezidivierend	Humira, Vit D, Salofalk	11,14	
105	2	33 Jahre	Chronisch-rezidivierend	Remicade	12,51	
118	3	13 Jahre	Chronisch-rezidivierend	Humira		

Aus isolierten PBMC wurde mittels Durchflusszytometrie ein immunologisches Profil der Spender erstellt.

Das Profil der Spender variierte in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität. Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen konnte bei den Kolitis-Patienten, abgesehen von UC 118, ein leichter Anstieg des Anteils der CD4+ Zellen an der Gesamtleukozytenpopulation gezeigt werden. Des Weiteren zeigten die Kolitis-Spender einen erhöhten Anteil der CD11b+ Makrophagen und der CD14+ Monozyten an der Leukozytenpopulation verglichen mit den Gesunden (Abbildung 6).

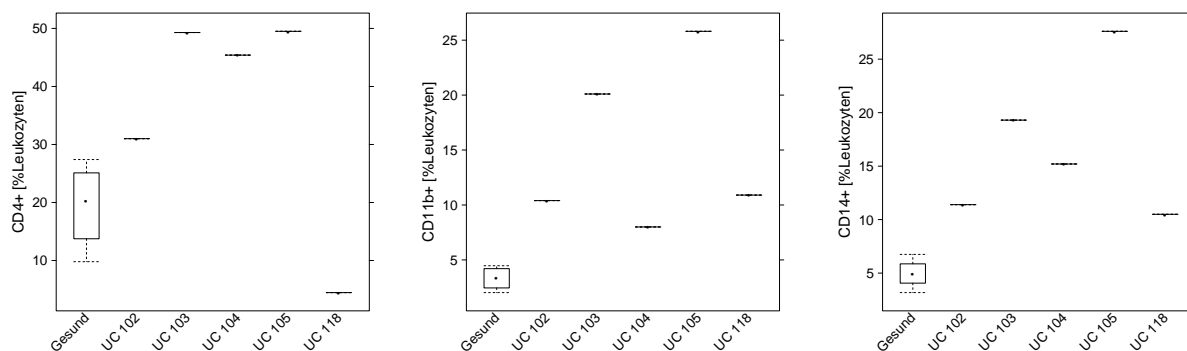


Abbildung 6: *Box and Whisker Plots* zur vergleichenden Darstellung des immunologischen Profils von gesunden Spendern und Kolitis-Patienten. Die gesunde Population wurde den zur Rekonstitution der Versuchstiere verwendeten Kolitis-Patienten gegenübergestellt. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

5.3. Untersuchung der *in vitro*-Effekt der Antigene Pr3 und CD99

Basierend auf der Protein-Chip Analyse, die CD99 als mögliches Autoantigen identifizierte, und den Beschreibungen in der Literatur, dass Kolitis-Patienten Antikörper gegen Proteinase 3 (Pr3) aufweisen (MAHLER et al. 2013), entschieden wir uns die Effekte der Antigene Pr3 und CD99 zunächst *in vitro* zu untersuchen. Isolierte PBMC von *Colitis ulcerosa*-Patienten (n=3) und gesunden Spendern (n=2) wurden über 48 Stunden in einer Zellkultur inkubiert. Ein Fokus wurde auf die Aktivierung der T-Zellen, die Makrophagen und Monozyten und die TH-Untergruppen gelegt. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten PBMC, die Zellen der Positivkontrolle wurden mit Phytohämagglutinin (PHA) behandelt.

Um die Aktivierung der T-Zellen beurteilen zu können, wurde zunächst der Anteil der Aktivierungsmarker CD4+CD69+ und CD4+CD134+ an den CD4+ Zellen untersucht.

In Anwesenheit des Antigens PHA, das als Positivkontrolle diente, kam es zu einer geringen Erhöhung der CD4+CD69+ Population und einer signifikanten Erhöhung der CD4+CD134+ Population von $21,69 \pm 12,15$ % auf $42,76 \pm 8,34$ %. Demgegenüber konnte durch Pr3 keine Aktivierung der CD4+CD69+ Zellen gezeigt werden, im Vergleich zu der Negativkontrolle kam es zu einer geringgradigen Erhöhung der CD4+CD134+ Zellen. CD99 zeigte keinen Effekt auf die Aktivierungsmarker (Abbildung 7).

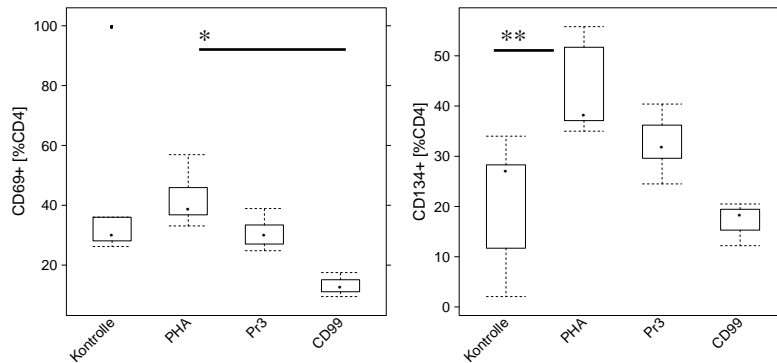


Abbildung 7: *Box and Whisker Plots* zur Darstellung des Anteils der CD4+CD69+ und CD4+CD134+ Zellen an der Population der CD4+ Zellen *in vitro*. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

Bei der Betrachtung der Untergruppen der T-Helferzellen konnte durch PHA, Pr3 und CD99 keine Beeinflussung der TH1, TH2 und TH22 Populationen gezeigt werden. Verglichen mit der Positivkontrolle erhöhte sich die Frequenz der TH17-Zellen (CD4+CCR4+CCR6+) durch Pr3 auf $19,52 \pm 4,40$ % (Abbildung 8).

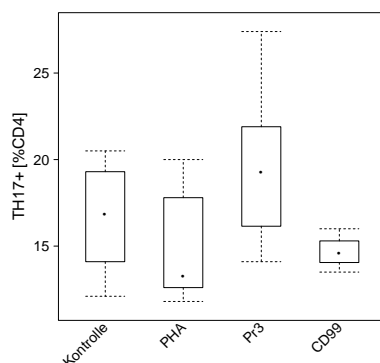


Abbildung 8: *Box and Whisker Plot* zur Darstellung des Anteils der TH17 Zellen an der Population der CD4+ Zellen *in vitro*. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

Um die Auswirkungen der Antigene auf die regulatorischen T-Zellen zu untersuchen, wurde die CD4+CCR4+ Zellpopulation genauer untersucht. Die Expression von CCR4 ist auf TH2 Zellen beschrieben (ISHIDA et al. 2003), aber auch CD4+FoxP3+ regulatorische T-Zellen exprimieren CCR4 (LI, N. et al. 2015). Gegenüber der Negativkontrolle sank der Anteil der CD4+CCR4+ Zellen an den CD4+ Zellen durch PHA auf $12,81 \pm 1,55$ % im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle ($17,06 \pm 1,91$ %). Verglichen mit PHA stieg die Frequenz der Zellen durch Pr3 auf $15,12 \pm 2,56$ % und durch CD99 auf $18,97 \pm 0,80$ % (Abbildung 9). Somit konnte ein Effekt der Antigene auf die regulatorischen T-Zellen gezeigt werden.

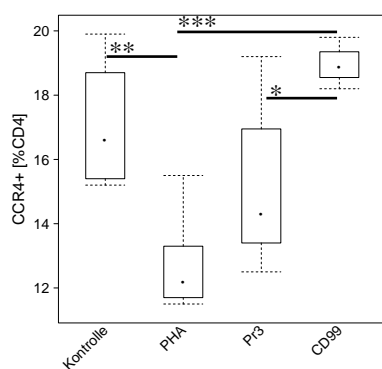


Abbildung 9: *Box and Whisker Plot* zur Darstellung des Anteils der CD4+CCR4+ Zellen an der Population der CD4+ Zellen *in vitro*. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

Bei der Betrachtung Makrophagen- und Monozytenpopulation zeigte sich durch Pr3 und CD99 ein Effekt auf die TSLPR exprimierenden Zellen. Der Anteil der CD11b+TSLPR+ Makrophagen an der CD11b+ Population lag durch die Behandlung mit PHA bei $2,26 \pm 1,49$ %. Durch die Behandlung mit CD99 stieg dieser Anteil der Zellen auf $6,84 \pm 4,05$ %. Pr3 übte keinen Effekt auf die Population der CD11b+TSLPR+ Zellen aus.

In Bezug auf CD99 wurde ein ähnliches Bild bei der Frequenz der CD14+TSLPR+ Monozyten beobachtet. Verglichen mit PHA ($3,73 \pm 3,24$ %) stieg der Anteil der Zellen an den CD14+ Zellen auf $10,08 \pm 5,32$ % (Abbildung 10).

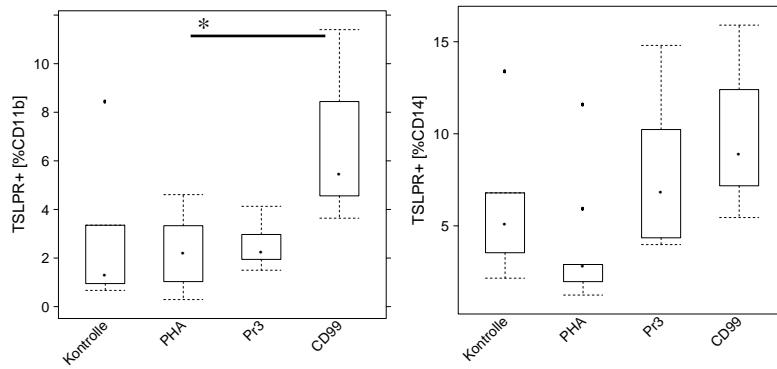


Abbildung 10: Box and Whisker Plots zur Darstellung des Anteils der CD11b+TSLPR+ Zellen und CD14+TSLPR+ Zellen an der Population der CD11b+ Zellen beziehungsweise CD14+ Zellen *in vitro*. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

5.4. Charakterisierung der immunologischen Vorgänge im Mausmodell

Um die immunologischen Mechanismen im Kolitis-Patienten genauer zu untersuchen, wurde ein translationales Tiermodell verwendet. In diesem Kontext erfolgte ein Rückschluss auf das immunologische Profil der Spender, durch die Analyse der Gesamtheit der humanen Zellen in der Maus. Hierfür wurde der Anteil der humanen CD45+ Zellen und der murinen CD45+ Zellen an der Leukozytenpopulation bestimmt.

Ein Einfluss von Ethanol auf die CD45+ Zellen konnte nicht festgestellt werden. Die Frequenz der humanen CD45+ Zellen fiel bei UC 103 signifikant von $30,87 \pm 12,28$ % in der Kontrollgruppe auf $17,67 \pm 18,16$ % in der Ethanolgruppe. Bei UC 105 konnte ein Anstieg der Frequenz von $8,81 \pm 5,43$ % auf $17,87 \pm 14,43$ % beobachtet werden. Die Krankheitsaktivität des Spenders schien diese Zellpopulation zu beeinflussen. Wurden Mäuse mit Spendern, die einen höheren SCCAI aufwiesen, rekonstituiert, konnte im Mittel ein verbesserter Rekonstitutionsgrad aufgezeigt werden (Abbildung 11).

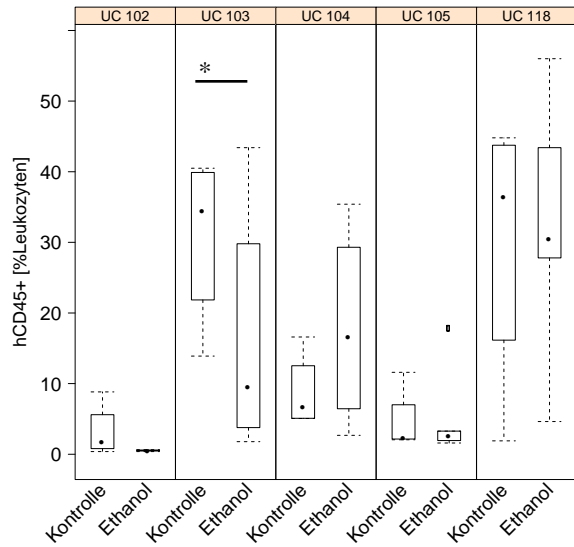


Abbildung 11: *Box and Whisker Plot* zur Darstellung des Anteils der humanen CD45+ Zellen an der Gesamtleukozytenpopulation in der Maus. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

5.5. Antigen-Effekte im Mausmodell

5.5.1. Auswirkungen von Pr3 und CD99 auf die klinische Aktivität

Für die Erfassung der klinischen Aktivität wurde das makroskopische Erscheinungsbild des Kolons, der klinische Score und das histologische Bild beurteilt.

Makroskopisch konnten in keiner Gruppe Veränderungen des Kolons beobachtet werden. Der Kot war geformt, der Darm war weder dilatiert noch verkürzt (Abbildung 12).

In keiner der Versuchsgruppen trat durch die Applikation von 30 % Ethanol eine Durchfallssymptomatik auf, so dass sich die Beurteilung des klinischen Scores auf den Gewichtsverlust und das Verhalten der Mäuse beschränkte. Das Auslösen der Kolitis durch die Ethanolgabe führte zu einer Erhöhung des Scores in der Ethanolgruppe, der Ethanol + Pr3 Gruppe und der Ethanol + CD99 Gruppe.

Im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe, erhöhte sich der klinische Score durch Ethanol signifikant. Durch die zusätzliche Gabe von Pr3 kam es zu einem weiteren signifikanten Anstieg des Scores verglichen mit der Ethanolgruppe. Die Erhöhung durch die Gabe von CD99 war im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle signifikant.

Der histologische Score stieg durch Ethanol im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe signifikant auf $2,12 \pm 0,64$ %. Die zusätzliche Gabe von Pr3 hatte keine

weiteren Auswirkungen. Durch CD99 erhöhte sich der Score signifikant auf $3,25 \pm 1,16$ % (Abbildung 13).

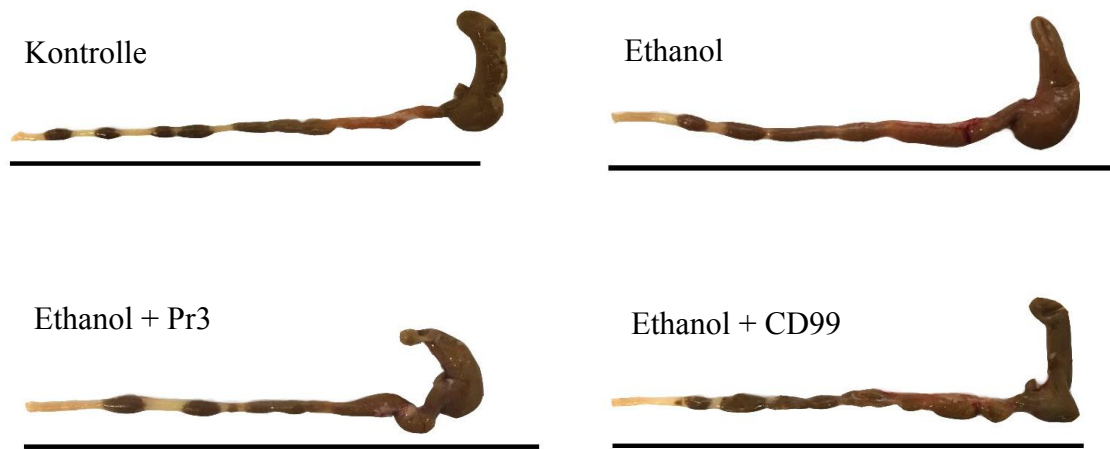


Abbildung 12: Vergleichende makroskopische Darstellung der Därme der Versuchsgruppen. Maßstab=10 cm

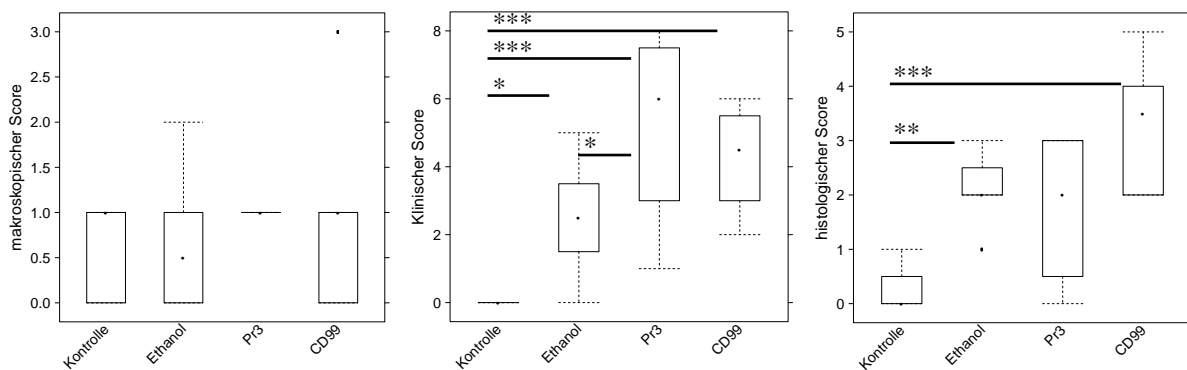


Abbildung 13: Box and Whisker Plots zur vergleichenden Darstellung der klinischen Aktivität der Versuchsgruppen. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

5.5.2. Auswirkungen von Pr3 und CD99 auf die Histologie

Die Gabe von Ethanol und Ethanol + CD99 führte zu einer signifikanten Erhöhung des histologischen Scores im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe.

Tiere, die mit Ethanol + Antigen behandelt wurden, zeigten ausgeprägte Ödeme und Zellinfiltration der Submukosa und des Mesenteriums im Vergleich mit der Ethanolgruppe und der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 14).

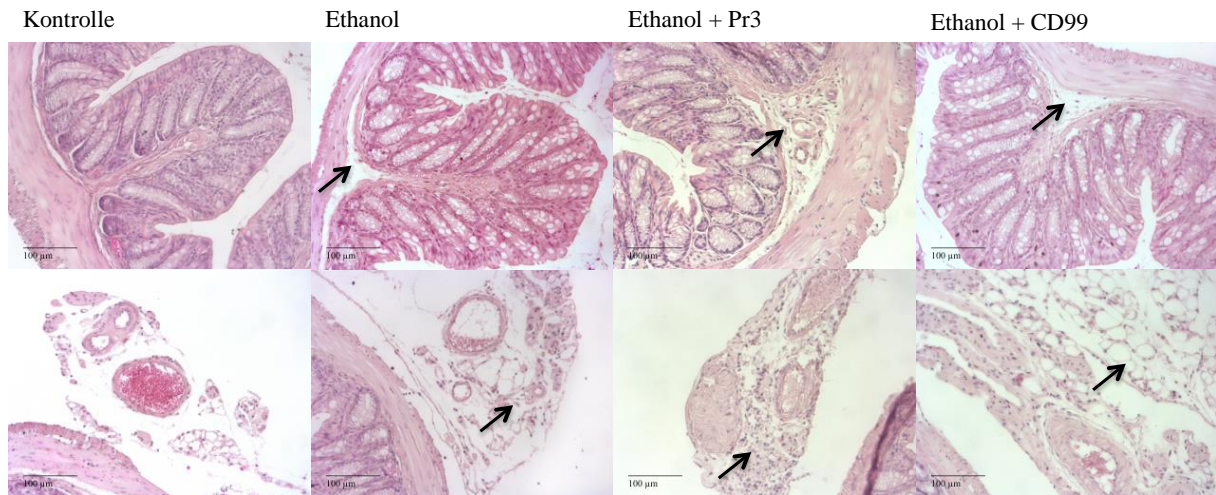


Abbildung 14: HE-Färbung zur vergleichenden Darstellung des histologischen Bildes der Versuchsgruppen. Aufnahmen in 20x Vergrößerung. Durch die Ethanol- und Antigenapplikation konnte eine vermehrte Ödematisierung und ein erhöhter Einstrom inflammatorischer Zellen beobachtet werden (schwarze Pfeile).

5.5.3. Auswirkungen von Pr3 und CD99 auf das immunologische Bild

Auswirkungen auf die T-Zellaktivierung

Um die T-Zellaktivierung zu untersuchen, wurde der Anteil der CD4+CD69+ Zellen und CD4+CD134+ Zellen an der Population der CD4+ Zellen betrachtet.

Es konnte ein geringer Einfluss von Ethanol auf die CD4+CD134+ Zellen gezeigt werden, dieser konnte durch Pr3 und CD99 nicht zusätzlich verstärkt werden (Abbildung 15).

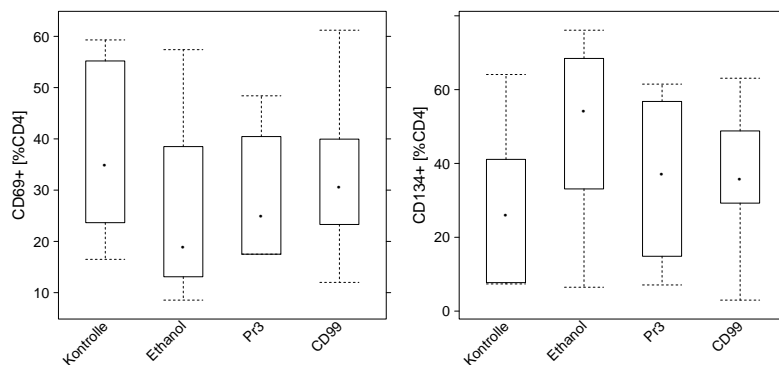


Abbildung 15: Box and Whisker Plots zur Darstellung des Anteils der CD4+CD69+ Zellen und CD4+CD134+ Zellen an der Population der CD4+ Zellen *in vivo*. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

Auswirkungen auf die regulatorischen T-Zellen

Durch Ethanol stieg der Anteil der regulatorischen CD4+CCR4+ Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle an. Die Applikation von Ethanol + Antigen führte zu keine weiteren Erhöhung des Anteils dieser Zellen an den CD4+ Zellen. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Alkohol die Effekte der Antigene überdeckt (Abbildung 16).

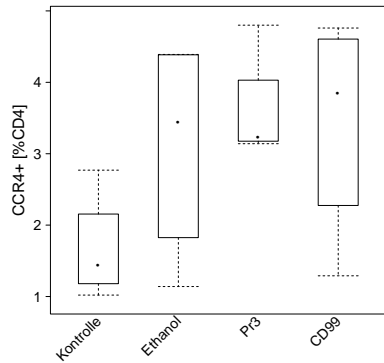


Abbildung 16: *Box and Whisker Plots* zur Darstellung des Anteils der CD4+CCR4+ Zellen an der Population der CD4+ Zellen *in vivo*. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

Auswirkungen auf Monozyten und Makrophagen

Die Antigene Pr3 und CD99 führten zu einem erhöhten Anteil der CD14+TSLPR+ Zellen an den CD14+ Zellen im Vergleich zu der Ethanolgruppe und der unbehandelten Kontrolle. Die Gabe von Ethanol+Pr3 übte zusätzlich einen Effekt auf die M2 Monozyten (CD14+CD163+CD206+) aus und führte zu einem Anstieg dieser Population.

In der Ethanolgruppe kam es zu einer signifikanten Erhöhung der CD11b+TSLPR+ Population im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Ebenso war der Anstieg der Frequenz dieser Zellpopulation durch Pr3 signifikant (Abbildung 17).

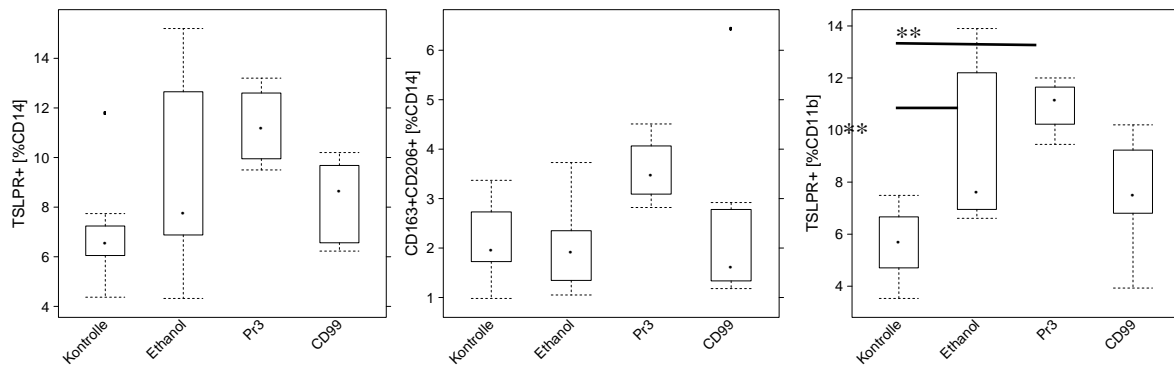


Abbildung 17: *Box and Whisker Plots* zur Darstellung des Anteils der CD14+TSLPR+ und der CD14+CD163+CD206+ Zellen an der Population der CD14+ Zellen und der CD11b+TSLPR+ Zellen an der Population der CD11b+ Zellen *in vivo*. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

5.5.4. Auswirkungen auf die Zellpopulationen im Kolon der Maus

Um einen genaueren Überblick über die inflammatorischen Mechanismen zu erhalten, wurden die humanen Zellen aus der *Lamina propria* des Kolons der Maus isoliert und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Da die Zellzahl pro Maus und pro Kolon zu gering gewesen wäre, wurden die Proben gruppenweise gepoolt.

Bei dem prozentualen Anteil der Untergruppen der CD4⁺ Zellen konnte ein Effekt der Antigene Pr3 und CD99 auf die aktivierten CD4⁺ Zellen gezeigt werden. Sowohl die Frequenz der CD4⁺CD25⁺ Zellen als auch der CD4⁺CD134⁺ Zellen stieg im Vergleich zu der Ethanolgruppe. Ethanol+Pr3 führte zu einem erhöhten Anteil der CD4⁺CD69⁺ Zellpopulation (Abbildung 18).

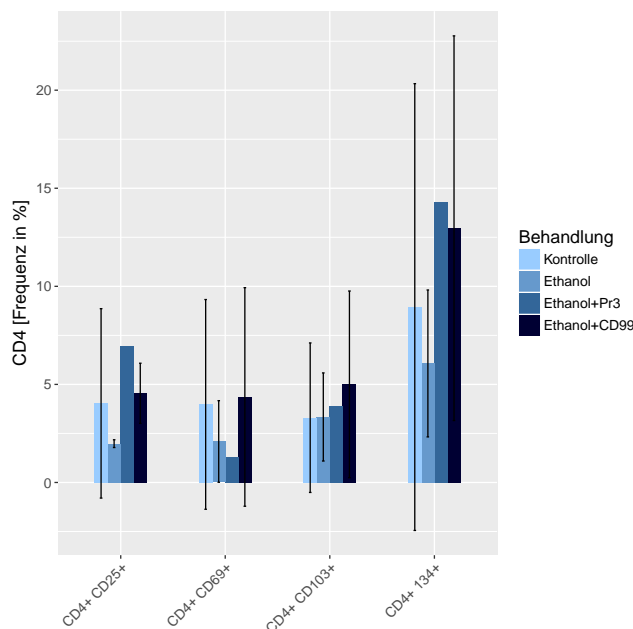


Abbildung 18: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Verteilung der CD4⁺ Zellen im Kolon der Maus. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung (schwarzer Fehlerbalken). Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

Den deutlichsten Effekt auf die CD11b⁺ Makrophagenpopulation hatten die Antigene Pr3 und CD99 im Hinblick auf die CD11b⁺CD1a⁺ Zellen. CD99 führte darüber hinaus zu einer erhöhten Frequenz der CD11b⁺TSLPR-exprimierenden Zellen. Durch die Ethanol und Antigenapplikation konnte kein deutlicher Effekt auf die CD11b⁺CD80/86⁺ und CD11b⁺E-Cadherin⁺ Zellpopulationen im Vergleich zu der Kontrollgruppe gezeigt werden (Abbildung 19).

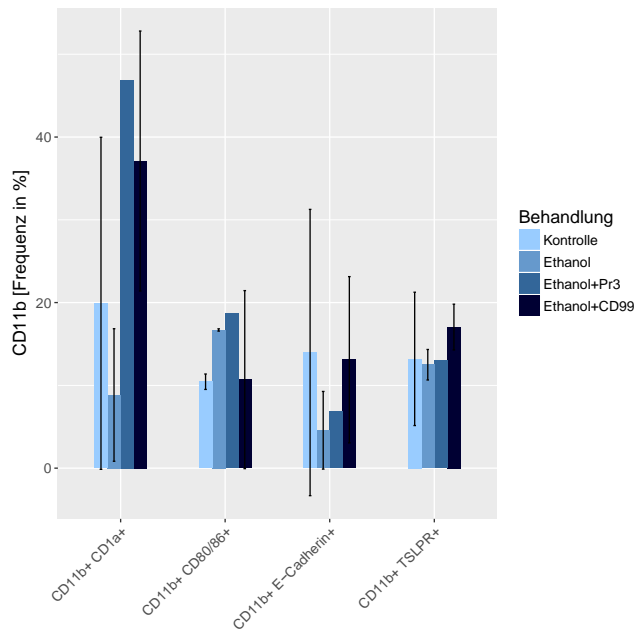


Abbildung 19: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Verteilung der CD11b+ Zellen im Kolon der Maus. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung (schwarzer Fehlerbalken). Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

Die Frequenz der CD14+ Zellen wurde vor allem durch Pr3 beeinflusst. Im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle und der Ethanolgruppe stieg der Anteil der CD14+CCR2+ Zellen und der CD14+CD1a+ Zellen am deutlichsten. Auch die CD14+CD80/86+ und CD14+TSLPR+ Zellpopulation wurden durch die Applikation von Ethanol+Pr3 beeinflusst (Abbildung 20).

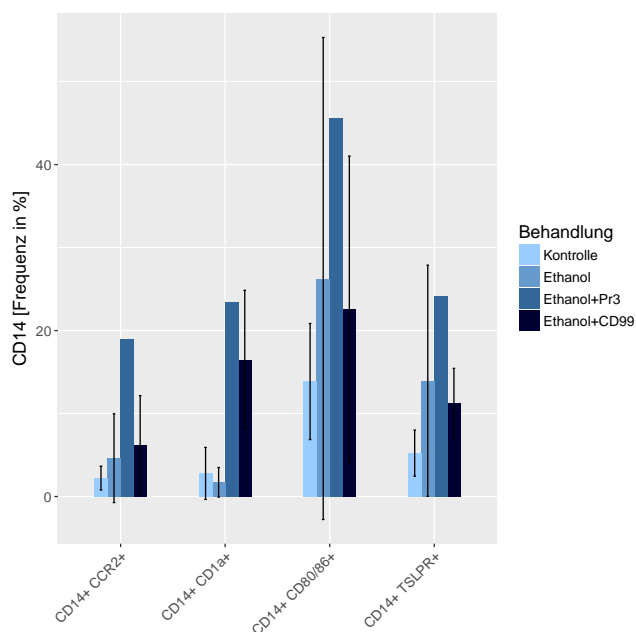


Abbildung 20: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Verteilung der CD14+ Zellen im Kolon der Maus. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung (schwarzer Fehlerbalken). Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

5.6. Effekt eines mTOR-Inhibitors im Mausmodell

Abhängig von dem immunologischen Spenderhintergrund und dem klinischen Aktivitätscore der Spender konnten im Mausmodell unterschiedliche Reaktionen auf den mTOR-Inhibitor Sirolimus gezeigt werden. In diesem Zusammenhang sollen die Versuche UC 103, UC 105 und UC 118 deshalb nachfolgend vergleichend gegenübergestellt werden.

5.6.1. Auswirkungen von Sirolimus auf die klinische Aktivität

Die klinische Aktivität wurde wie zuvor anhand des makroskopischen Erscheinungsbildes des Darmes, des klinischen Scores und der Histologie bewertet. Bei Versuch UC 103 wurde ein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelter Kontrollgruppe und Ethanol sichtbar. In der Ethanolgruppe traten ungeformter Kot, Dilatationen des Kolons und Hämorrhagien auf. Im Gegensatz dazu waren in der Sirolimusgruppe keine krankhaften makroskopischen Veränderungen des Darmes erkennbar. Dieser Unterschied zwischen Ethanolgruppe und Sirolimusgruppe war ebenfalls signifikant. Wurden Mäuse mit Spendern, die einen geringen SCCAI (UC 105 und UC 118) aufwiesen, rekonstituiert, konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen und keine makroskopischen Auffälligkeiten beobachtet werden (Abbildung 21).

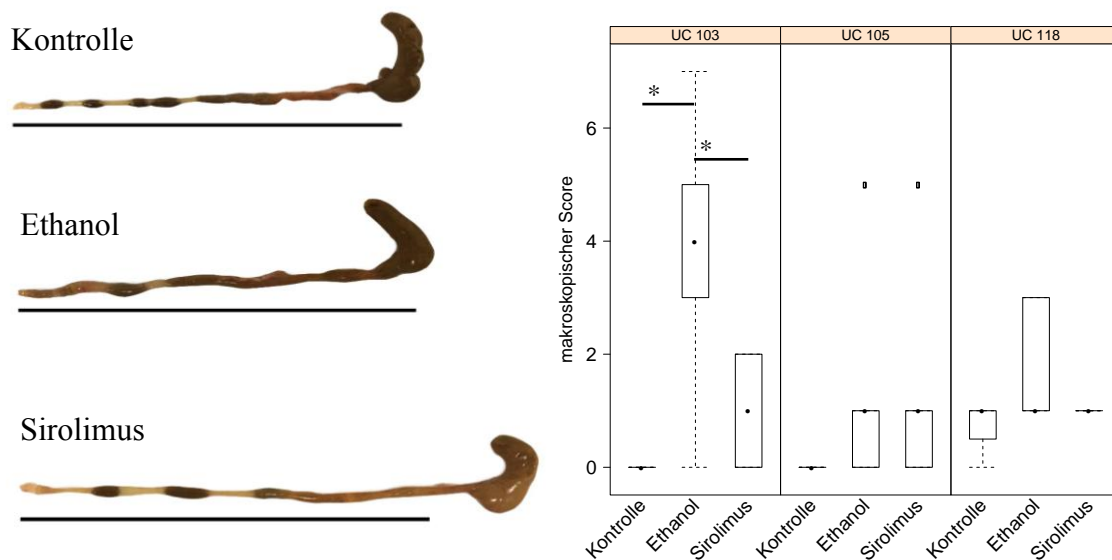


Abbildung 21: Vergleichende makroskopische Darstellung der Därme und des makroskopischen Scores der Versuchsgruppen. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt. Maßstab=10 cm

Bei UC 103 stieg der klinische Score in der Ethanolgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe und Sirolimus signifikant auf $15,17 \pm 5,67$ %. Die Mäuse entwickelten flüssigen Durchfall, zeigten Gewichtsverlust, ruhigeres Verhalten und intermittierende Buckelhaltung. Ein Tier wurde vorzeitig aus dem Versuch genommen. Durch Sirolimus kam es zu keiner Erhöhung des klinischen Scores. Lediglich am Tag nach der rektalen Applikation von Ethanol wurde ein Gewichtsverlust beobachtet, der sich wieder normalisierte. Bei UC 105 und UC 118 konnte ein geringfügig erhöhter klinischer Score in der Ethanolgruppe gezeigt werden. In der Sirolimusgruppe entwickelten bei UC 105 drei Tiere breiigen Durchfall, ein Tier wurde aufgrund von permanenter Buckelhaltung und einem Gewichtsverlust von > 15 % vorzeitig aus dem Versuch genommen. In der Sirolimusgruppe von Versuch UC 118 konnte kein wesentlicher Unterschied im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 22).

Der histologische Score stieg bei UC 103 in der Ethanolgruppe an, jedoch war dieser Effekt nicht signifikant. Bei UC 105 stieg der Score der Ethanol- und Sirolimusgruppe ebenfalls leicht an. Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle kam es bei UC 118 zu einem signifikanten Anstieg des histologischen Scores. In der Sirolimusgruppe hingegen fiel der Score im Vergleich zu der Ethanolgruppe wieder signifikant ab. Insgesamt konnte in den Ethanolgruppen eine vermehrte zelluläre Infiltration und Ödematisierung beobachtet werden (Abbildung 22).

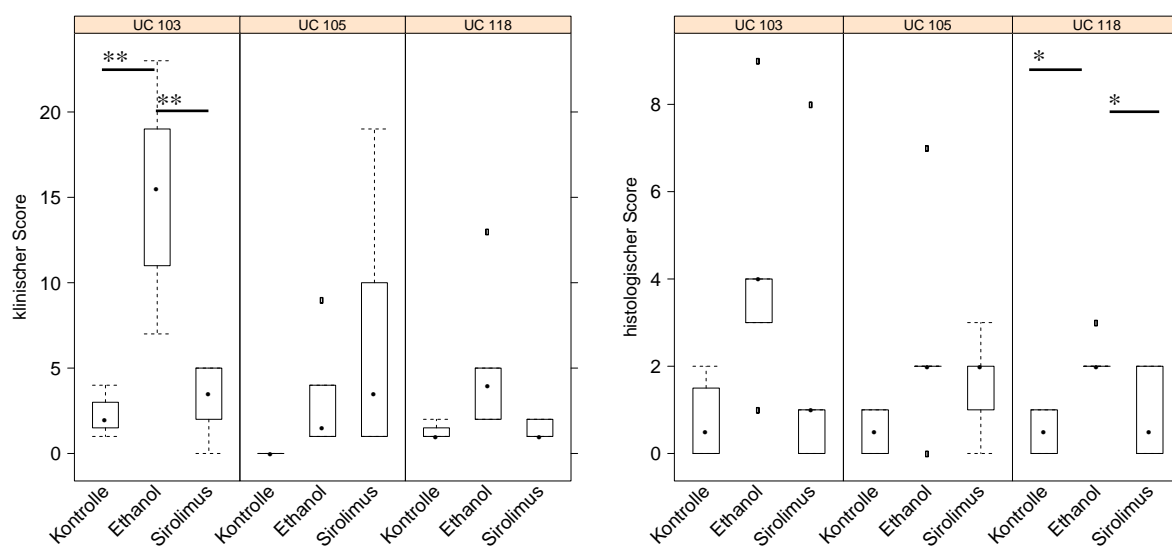


Abbildung 22: *Box and Whisker Plots* zur Darstellung des klinischen und histologischen Scores der Versuchsgruppen. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

5.6.2. Auswirkungen von Sirolimus auf die Histologie

Das mikroskopische Bild des Kolons der Mäuse war in der Ethanolgruppe durch eine Ödematisierung und erhöhte Zellinfiltration geprägt. Im Verlauf der Behandlung mit Sirolimus kam es zur Ausbildung geringgradiger Ödeme mit Zellinfiltration, die histologischen Veränderungen stellten sich in der Ethanolgruppe jedoch deutlicher dar (Abbildung 23).

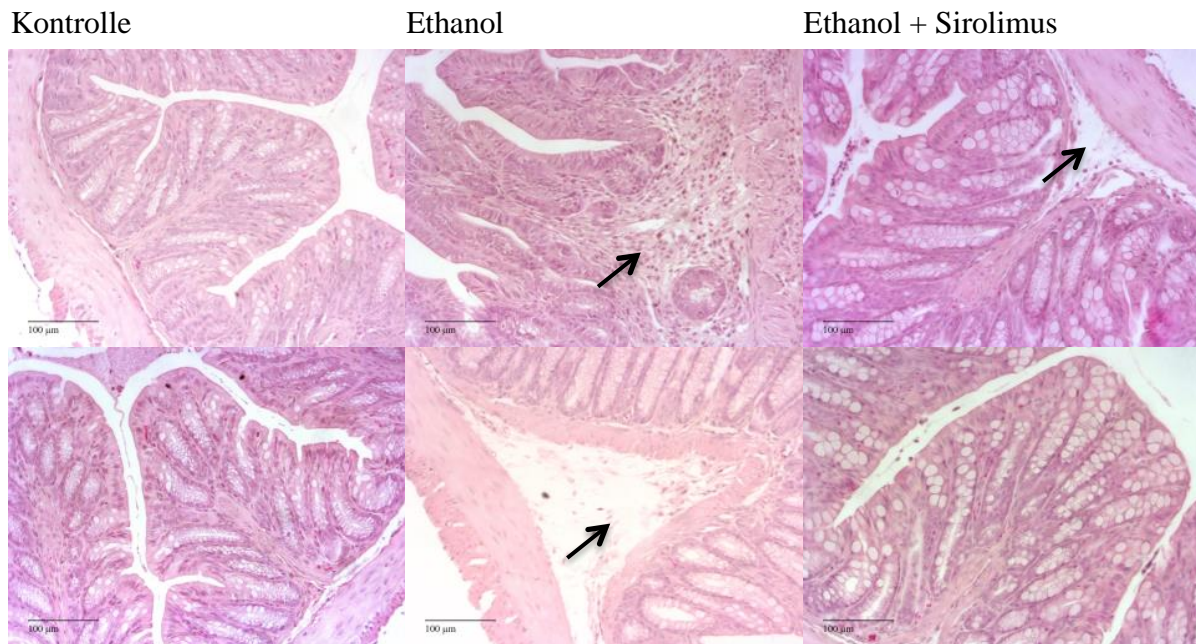


Abbildung 23: HE-Färbung zur vergleichenden Darstellung des histologischen Bildes der Versuchsgruppen. Aufnahmen in 20x Vergrößerung. Durch die Ethanol- und Antigenapplikation konnte eine vermehrte Ödematisierung und ein erhöhter Einstrom inflammatorischer Zellen beobachtet werden (schwarze Pfeile).

5.6.3. Auswirkungen von Sirolimus auf das immunologische Bild

Effekte auf die regulatorischen T-Zellen

Bei UC 103 stieg der Anteil der CD4+CCR4+ Zellen an den CD4+ Zellen durch die Behandlung mit Sirolimus verglichen mit der Kontrollgruppe und der Ethanolgruppe auf $3,71 \pm 1,34$ % an. In den Versuchen UC 105 und UC 118 konnte ebenfalls ein Anstieg der Frequenz im Vergleich zur Ethanolgruppe beobachtet werden. Dieser war jedoch nicht signifikant (Abbildung 24).

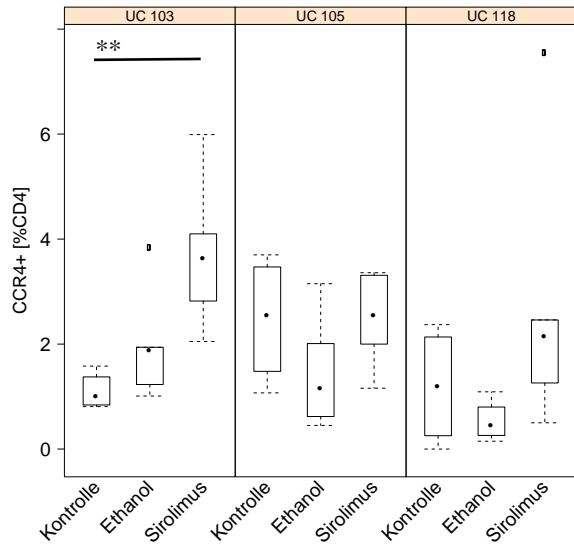


Abbildung 24: *Box and Whisker Plot* zur Darstellung des Anteils der CD4+CCR4+ Zellen an der Population der CD4+ Zellen *in vivo*. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

Effekte auf Monozyten und Makrophagen

Durch die Ethanolapplikation und Ethanol+Sirolimusgabe kam es bei UC 103 und UC 118 zu einem Anstieg des Anteils der CD11b+CD1a exprimierenden Zellen an den CD11b+ Zellen. Bei UC 105 hingegen sank durch Ethanol die Frequenz der CD11b+CD1a+ Zellen signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, durch Sirolimus stieg die Frequenz signifikant auf $76,94 \pm 2,62$ %.

Die Frequenz der CD11b+TSLPR+ Zellen wurde in keinem der Versuche durch Sirolimus signifikant beeinflusst. Durch Ethanol kam es bei UC 103 zu einem geringgradigen Anstieg von $5,26 \pm 1,82$ % auf $7,68 \pm 3,61$ %, bei UC 118 von $7,99 \pm 1,29$ % auf $9,42 \pm 3,96$ %. Bei UC 105 fiel der Anteil der CD11b+TSLPR+ Zellen von $6,56 \pm 2,01$ % auf $4,98 \pm 1,36$ % in der Ethanolgruppe (Abbildung 25).

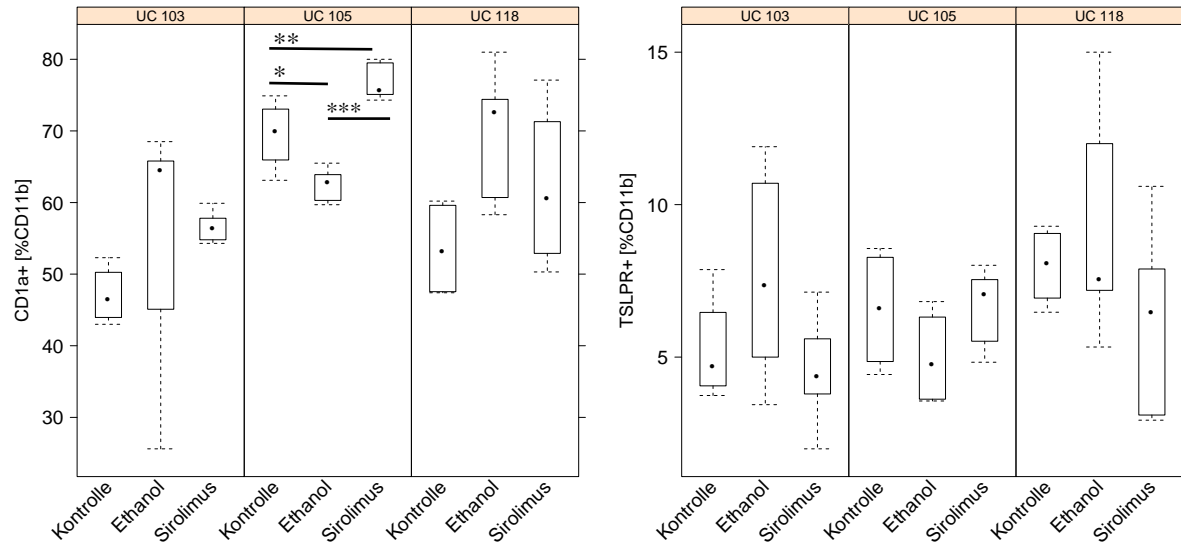


Abbildung 25: *Box and Whisker Plots* zur Darstellung des Anteils der CD11b+CD1a+ Zellen und der CD11b+TSLPR+ Zellen an der Population der CD11b+ Zellen *in vivo*. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

Durch Ethanol und Sirolimus kam es bei UC 103 zu keiner signifikanten Beeinflussung des Anteils der CD14+CD1a+ Zellen an den CD14+ Zellen. Die Frequenz der Zellen stieg in der Ethanolgruppe leicht von $22,43 \pm 2,3$ % auf $38,30 \pm 22,24$ % und in der Sirolimusgruppe auf $41,60 \pm 15,79$ %. Bei UC 105 und UC 118 konnte ein signifikanter Anstieg der CD14+CD1a+ Zellpopulation sowohl in der Ethanol- als auch in der Sirolimusgruppe gezeigt werden.

Eine signifikante Veränderung des Anteils der CD14+TSLPR+ Zellen war lediglich bei UC 105 sichtbar. Die Frequenz dieser Zellpopulation stieg durch Sirolimus signifikant verglichen mit der Ethanolgruppe. Bei UC 118 konnte ein leichter Anstieg der CD14+TSLPR+ Zellen beobachtet werden (Abbildung 26).

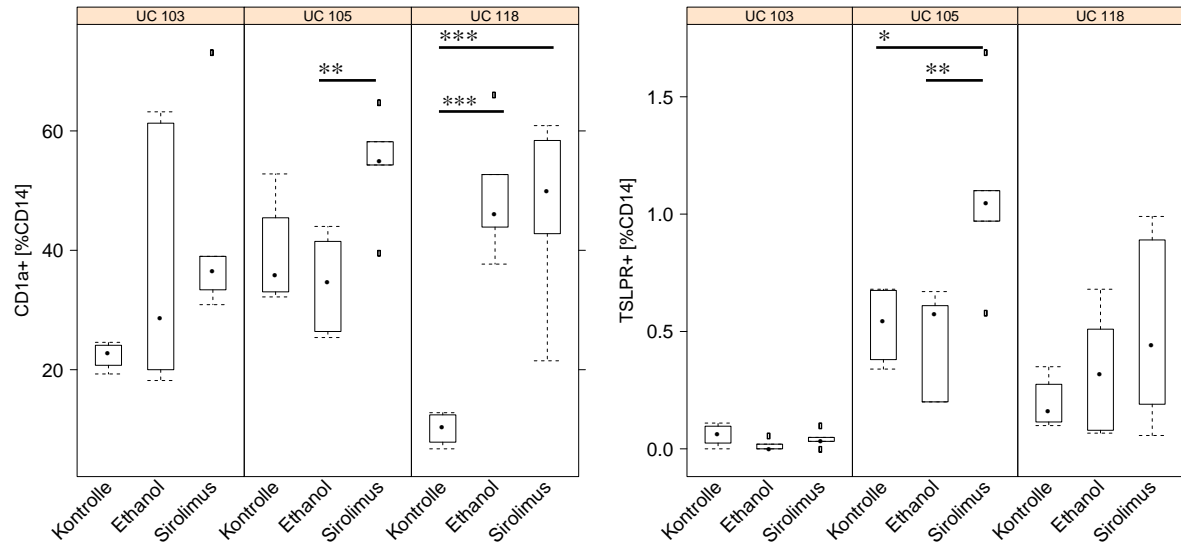


Abbildung 26: *Box and Whisker Plots* zur Darstellung des Anteils der CD14+CD1a+ Zellen und der CD14+TSLPR+ Zellen an der Population der CD14+ Zellen *in vivo*. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

Der Anteil der CD14+CD64+ Zellen an den CD14+ Zellen stieg bei UC 103 von $9,60 \pm 4,14$ % in der Kontrollgruppe auf $12,68 \pm 7,03$ % in der Ethanolgruppe und durch die Behandlung mit Sirolimus auf $16,25 \pm 3,80$ %. Bei UC 105 erhöhte sich die Frequenz dieser Zellpopulation in der Sirolimusgruppe im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle von $12,42 \pm 3,45$ % auf $18,74 \pm 3,13$ %. Die CD14+CD64+ Zellpopulation wurde bei UC 118 durch die Ethanolbehandlung leicht beeinflusst und stieg von $6,58 \pm 5,36$ % auf $15,71 \pm 10,59$ %.

Bei der Betrachtung der M2 Monozyten (CD14+CD163+CD206+) konnte bei UC 103 ein signifikanter Anstieg in der Ethanol- und Sirolimusgruppe im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden. Sowohl bei UC 105 als auch bei UC 118 stieg der Anteil der CD14+CD163+CD206+ Zellen an der Population der CD14+ Zellen durch die Gabe von Sirolimus leicht an (Abbildung 27).

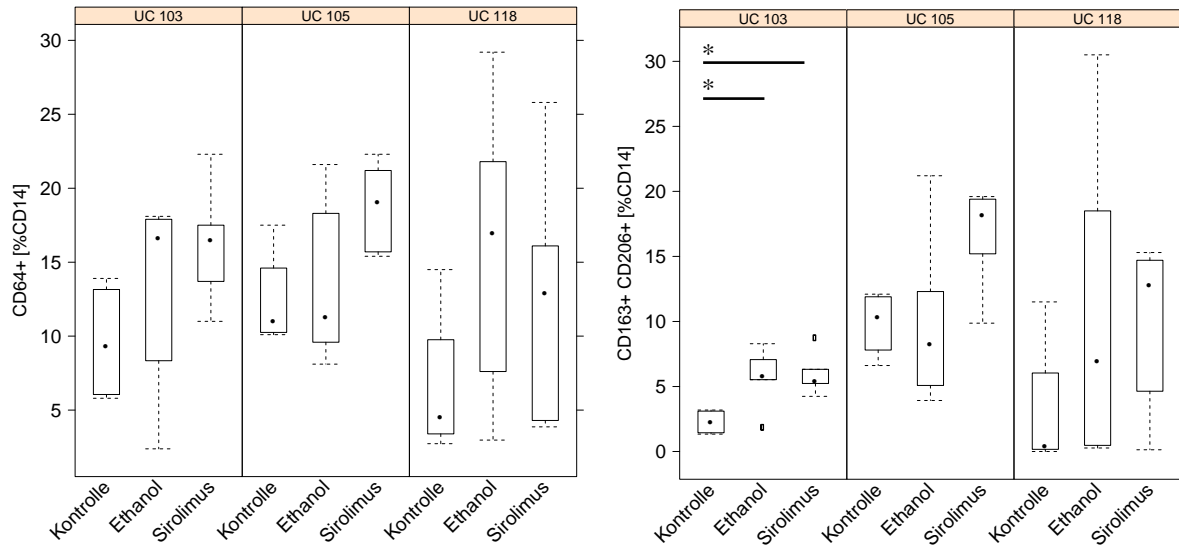


Abbildung 27: *Box and Whisker Plots* zur Darstellung des Anteils der CD14+CD64+ Zellen und der CD14+CD163+CD206+ Zellen an der Population der CD14+ Zellen *in vivo*. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

5.6.4. Auswirkungen von Sirolimus auf die Zellpopulationen im Kolon der Maus

Wie zuvor beschrieben wurden die humanen Zellen aus der *Lamina propria* des Kolons der Mäuse isoliert und mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Durch die Gabe von Sirolimus erhöhte sich der Anteil der CD4+CD134+ Zellpopulation an den CD4+ Zellen geringradig. Die übrigen T-Zell-Aktivierungsmarker blieben weitestgehend unbeeinflusst (Abbildung 28).

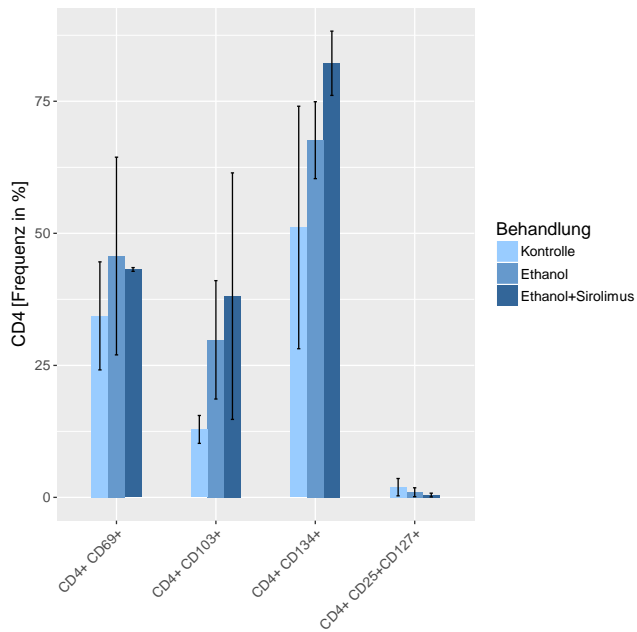


Abbildung 28: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Verteilung der CD4+ Zellen im Kolon der Maus. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung (schwarzer Fehlerbalken). Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

Die Population der CD11b+ Makrophagen blieb durch die Ethanol- und Sirolimusbehandlung im Vergleich zu der Kontrollgruppe unbeeinflusst (Abbildung 29).

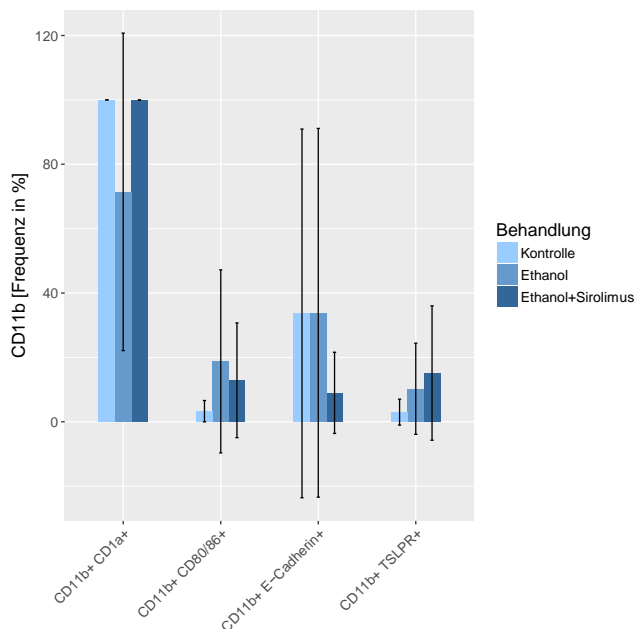


Abbildung 29: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Verteilung der CD11b+ Zellen im Kolon der Maus. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung (schwarzer Fehlerbalken). Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

Bei der Betrachtung der Population der CD14⁺ Zellen konnte ein geringer Einfluss der Ethanolapplikation auf die Frequenz der CD14⁺CD1a⁺ Zellen gezeigt werden. Sirolimus übte keinen Effekt auf die Monozytenpopulation aus (Abbildung 30).

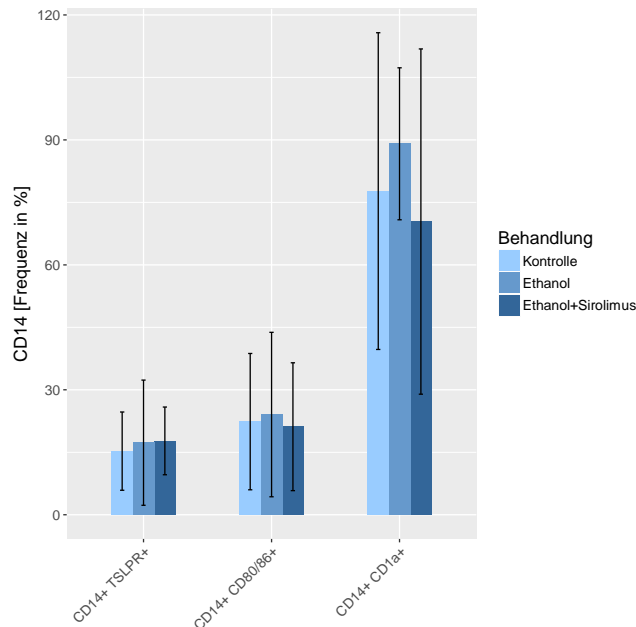


Abbildung 30: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Verteilung der CD14⁺ Zellen im Kolon der Maus. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung (schwarzer Fehlerbalken). Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

5.6.5. Auswirkungen von Sirolimus auf das Zytokinprofil

Aus den Kolonproben der Versuche UC 103 und UC 105 wurde mRNA isoliert und eine qRT-PCR in Hinblick auf die Expression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine durchgeführt. In beiden Versuchen konnte eine Erhöhung des pro-inflammatorisch wirkenden murinen TARC (mTARC) durch die Behandlung mit Sirolimus im Vergleich zur Ethanolgruppe gezeigt werden. Zwischen der Kontroll- und Sirolimusgruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 31).

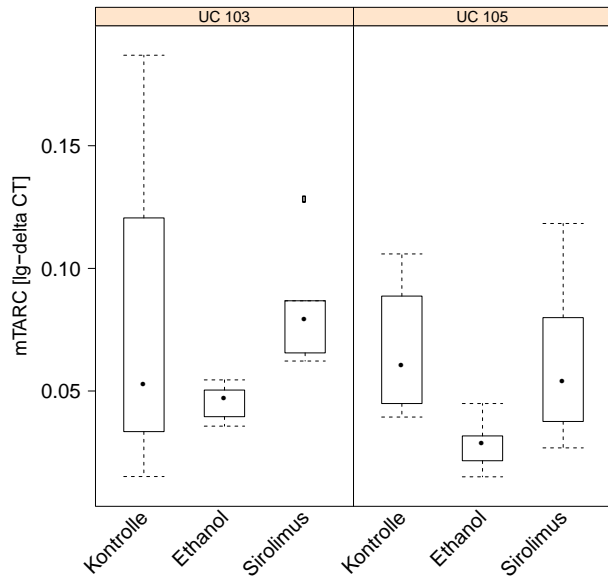


Abbildung 31: *Box and Whisker Plots* zur Darstellung der logarithmierten delta CT-Werte des murinen TARC. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

In dem Versuch UC 103 konnte in keiner Gruppe ein Effekt auf das anti-inflammatorische Zytokin HGF beobachtet werden. Durch die Gabe von Ethanol und die zusätzliche Behandlung mit Sirolimus kam es bei UC 105 zu einem Anstieg von HGF verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 32).

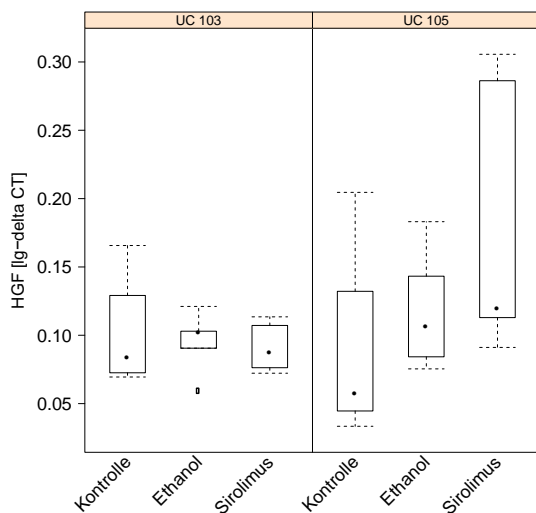


Abbildung 32: *Box and Whisker Plots* zur Darstellung der logarithmierten delta CT-Werte von HGF. Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

Die Expression des potentiell anti-inflammatorischen Zytokins TGF β konnte bei UC 103 ebenfalls in keiner Versuchsgruppe beeinflusst werden. Die Gabe von Ethanol induzierte bei UC 105 die Bildung von murinem TGF β (m TGF β), durch die Applikation von Sirolimus näherten sich die Werte wieder der Kontrollgruppe an (Abbildung 33).

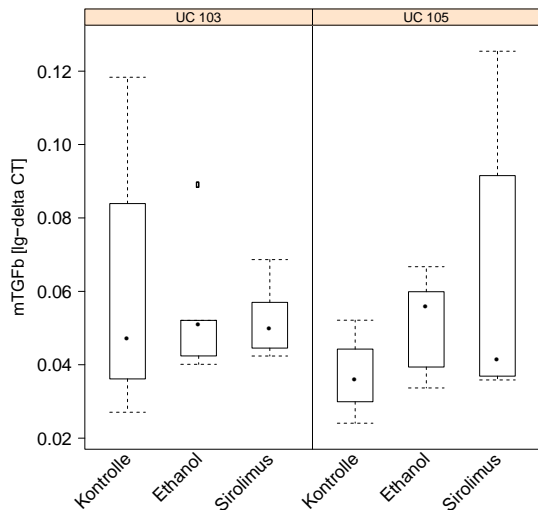


Abbildung 33: *Box and Whisker Plots* zur Darstellung der logarithmierten delta CT-Werte des murinen TGF β . Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

Das inflammatorisch wirkende Zytokin IFN γ stieg bei UC 103 durch die Ethanolgabe an. Durch Sirolimus hingegen konnte keine erhöhte Expression beobachtet werden.

Bei Versuch UC 105 ließ sich weder durch Ethanol noch durch Ethanol+Sirolimus ein Effekt auf IFN γ verzeichnen (Abbildung 34).

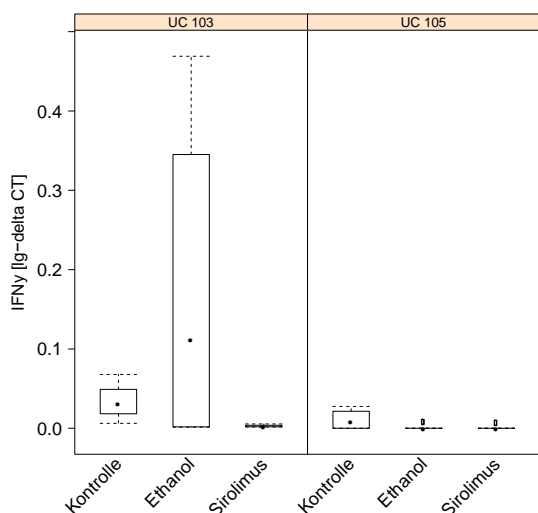


Abbildung 34: *Box and Whisker Plots* zur Darstellung der logarithmierten delta CT-Werte von IFN γ . Mittelwerte, Standardabweichung, Anzahl und p-Werte sind im Anhang aufgeführt.

6 Diskussion

6.1. Ziel I: Identifizierung möglicher krankheitsrelevanter Autoantigene in Kolitis-Patienten

6.1.1. Hypothese 1: Autoimmunität beeinflusst den Entzündungsprozess bei *Colitis ulcerosa*

Autoantikörper wie ANCA und PAB konnten bisher in Kolitis-Patienten identifiziert werden (MITSUYAMA et al. 2016). Pr3-ANCA sind gegen die Proteinase 3 gerichtete Antikörper, die bei primärer sklerosierender Cholangitis, einer häufigen Erkrankung von Kolitis-Patienten, nachgewiesen werden (STINTON et al. 2014). Ob und wie sie auf den Entzündungsprozess bei ulzerativer Kolitis einwirken, wurde noch nicht genauer betrachtet.

Um weitere potentielle Autoantigene zu identifizieren, wurden mittels Protein-Chip von Professor Weinhäusl am AIT in Wien Proben von Kolitis-Patienten und nicht Erkrankten auf die Expression von 7390 Proteinen untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass Kolitis-Patienten gegenüber nicht Erkrankten signifikant höhere Werte von Antikörpern gegen CD99 aufwiesen (Daten nicht aufgeführt).

CD99 ist ein Glykoprotein, das auf Oberflächen von hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (ENEIN et al. 2016) und eine wichtige Rolle bei der Leukozytenmigration, Apoptose, Zelldifferenzierung und Adhäsion spielt (GIL et al. 2015).

Der Nachweis mehrerer Autoantigene in Kolitis-Patienten, lässt die Hypothese, dass Autoimmunität den Entzündungsprozess bei *Colitis ulcerosa* beeinflusst, sehr wahrscheinlich erscheinen.

6.2. Ziel II: Verständnis der immunologischen Vorgänge vor dem Hintergrund eines autoimmunen Prozesses *in vitro*

6.2.1. Hypothese 2: Einfluss der Autoantigene auf die Immunzellen *in vitro*

Um die Wirkung von Autoantigenen auf die Immunzellen zu untersuchen, wurden die in Seren von Kolitis-Patienten gemessenen Antigene Pr3 und CD99 gewählt und PBMC von Spendern mit Antikörpern gegen Pr3 und CD99 in einer Zellkultur inkubiert. Die Untersuchung der Antigenwirkung *in vitro* zeigte unterschiedliche Auswirkungen auf die verschiedenen Zelltypen.

T-Zellaktivierung

Zunächst fiel eine differierende Beeinflussung der T-Zell-Aktivierungsmarker CD69 und CD134 auf. Bei CD69 handelt es sich um einen Marker der frühen T-Zellaktivierung. Die Expression von CD134 (OX40) ist nach einer Stimulierung durch Antigene beschrieben (XIAOYAN et al. 2006).

Wie erwartet konnte durch PHA die Aktivierung der T-Zellen durch die Erhöhung des Aktivierungsmarkers CD134 gezeigt werden. Da weder durch PHA noch durch Pr3 und CD99 die CD4+CD69+ Zellpopulation beeinflusst werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass dieser frühe Aktivierungsmarker aufgrund des Messzeitpunktes nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

Durch das Fremdantigen PHA konnte eine Aktivierung der CD4+CD134+ Zellen dargestellt werden. Dass durch die Autoantigene Pr3 und CD99 kein Effekt auf die CD4+CD134+ Zellen ausgeübt wurde, könnte mit der Tatsache erklärt werden, dass die Zellen zwischen *self* und *non-self* unterscheiden und somit durch die fremden Autoantigene keine T-Zellen aktiviert werden.

TH- Untergruppen

Die Betrachtung der Untergruppen der T-Helferzellen nach Antigenstimulation zeigte keine eindeutigen Effekte. Einzig der Anstieg der TH17-Zellen durch Pr3 ist insofern interessant, als dass TH17-Zellen sowohl pro-inflammatorisch wirken und für die Ausbildung einer Autoimmunität verantwortlich sind, als auch die mukosale Abwehr aufrecht erhalten (ZHOU et al. 2008). Die Differenzierung der TH17-Zellen ist durch die Abhängigkeit von TGF β des Weiteren eng mit der Differenzierung der regulatorische T-Zellen verbunden. Ebenso beeinflussen das Zytokinmilieu und die verschiedenen metabolischen Signalwege die Transdifferenzierung von Tregs und TH17-Zellen (ZHOU et al. 2009). Dies lässt vermuten, dass bei Vorliegen pro-inflammatorischer Zytokine und niedrigen Konzentrationen von TGF β der Entzündungsprozess durch Pr3 unterstützt wird, da naive T-Zellen zu TH17-Zellen differenzieren.

Regulatorische T-Zellen

Interessanterweise zeigte die nachfolgende Untersuchung der CD4+CCR4+ regulatorischen T-Zellen einen deutlichen Abfall der Zellpopulation durch die Behandlung mit PHA im Vergleich zu der Negativkontrolle. Der Marker CCR4 wird auf TH2 Zellen und

regulatorischen T-Zellen exprimiert. Sowohl TH2 Zellen als auch Tregs kontrollieren die pro-inflammatorische Immunantwort (RIVINO et al. 2004; SUGIYAMA et al. 2013).

In der Regel kann durch PHA die Differenzierung regulatorischer T-Zellen stimuliert werden (IMAI et al. 1999). Es ist in Bezug auf CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen, aber auch beschrieben, dass durch PHA meistens kein vollständiger regulatorischer Phänotyp exprimiert wird. Hier führt eine Stimulation durch TCR in Kombination mit TGFβ zu besseren Ergebnissen (VALENCIC et al. 2007). Ähnliches wäre auch für CD4⁺CCR4⁺ Zellen denkbar.

Im Hinblick auf die Antigene Pr3 und CD99 konnte ein Anstieg der CD4⁺CCR4⁺ Zellen besonders durch die Behandlung mit CD99 beobachtet werden. Dies kann auf ein hochgradig aktiviertes Immunsystem hindeuten, da durch die Präsentation eines Autoantigens die Differenzierung regulatorischer Zellen gefördert wird, um die Entzündung zu kontrollieren und die pro-inflammatorische Reaktion in eine anti-inflammatorische Reaktion umzukehren.

Monozyten und Makrophagen

In Zusammenhang mit der Immunregulation durch regulatorische Zellen ist auch der Anstieg der Frequenz der CD11b⁺TSLPR⁺ Makrophagen durch CD99 zu betrachten. CD11b⁺ Makrophagen sind wie regulatorische T-Zellen dafür verantwortlich, der Entzündungsreaktion entgegenzuwirken (KATARU et al. 2009). Frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass CD11b⁺TSLPR⁺ Makrophagen in Verbindung mit einem akuten Entzündungsgeschehen gebracht werden können (FOHLINGER et al. 2016). Des Weiteren wurden in Kolitis-Patienten niedrige Konzentrationen an TSLP gemessen (Daten nicht aufgeführt). Normalerweise wird TSLP von geschädigten Epithelzellen sezerniert und induziert unter anderem die Reifung von dendritischen Zellen und M2 Monozyten. Durch TSLP aktivierte dendritische Zellen exprimieren OX40L und induzieren in Abwesenheit von IL-12 die Differenzierung der TH2-Zellen und fördern so den Wundheilungsprozess (ITO et al. 2012). Fehlt TSLP, so wird die Differenzierung der naiven T-Zellen in inflammatorische TH1-Zellen bevorzugt. Geht man nun noch davon aus, dass ein autoimmunes Geschehen zugrunde liegt, führt die Präsentation der Autoantigene durch MHC-Moleküle zu einer ständigen weiteren Aktivierung des Immunsystems und somit zu einem Toleranzverlust.

6.3. Ziel III: Validierung der *in vitro* generierten Ergebnisse im NSG-Mausmodell

6.3.1. Hypothese 3.1. und 3.2: Auswirkung der Antigene auf die klinische Aktivität

Um der These nachzugehen, dass Autoimmunität als treibende Kraft hinter dem Entzündungsprozess bei Colitits ulcerosa steht, wurde die Wirkung der Autoantigen Pr3 und CD99 *in vivo* untersucht. Frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen, dass in NOD-scid IL2Ry-chain^{null} Mäusen durch die Applikation von 50 % Ethanol Kolitissymptome ausgelöst werden können (PALAMIDES et al. 2016). Um die Wirkung von Antigenen in dem NSG-Mausmodell zu testen, wurde die Ethanolkonzentration auf 30 % reduziert, damit mögliche Effekte von Pr3 und CD99 nicht durch den Alkohol maskiert würden.

Makroskopisch waren keine Veränderungen des Kolons zu erkennen. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da durch die Gabe von 30 % Ethanol der Reiz, um die Krankheitssymptome auszulösen, deutlich verringert wurde. Die Betrachtung des klinischen Scores zeigte jedoch, dass sich die klinische Aktivität durch Ethanol und Ethanol + Antigen wie erwartet beeinflussen ließ. Zwar beschränkte sich die Beurteilung auf den Gewichtsverlust und das Verhalten der Mäuse, dennoch war eine signifikante Erhöhung des Scores durch die Gabe der Antigene zu erkennen.

Dieses Bild spiegelte sich auch in der Histologie durch einen erhöhten Zelleinstrom und Ödematisierung des Gewebes durch Ethanol + Antigen wider. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Gabe von Autoantigenen die immunologische Vorgänge so beeinflusst, dass das klinische und histologische Bild pathologisch verändert wird.

6.3.2. Hypothese 3.3: Untersuchung des Effektes der Antigene auf das immunologische Profil der NSG-Maus

T-Zellaktivierung

In Hinblick auf die T-Zellaktivierung konnte die Expression der CD4+CD69+ Zellen weder durch die Gabe von Ethanol noch durch Ethanol + Antigen beeinflusst werden. Dies bestätigt die Ergebnisse der *in vitro* Analyse. Auch hier kann CD69 als früher Aktivierungsmarker wahrscheinlich nicht mehr nachgewiesen werden.

Durch die Applikation von Ethanol stieg der Anteil der CD4+CD134+ Zellen in der Milz, durch die Gabe von Ethanol + Antigen konnte die Zellpopulation nicht weiter beeinflusst werden. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass humane Zellen in der Maus aufgrund der Besiedelung der Milz aktiviert werden. Hierfür sprechen auch die erhöhten

Werte der Kontrollgruppe. Werden der Maus menschliche Zellen appliziert, so werden diese aktiviert und unabhängig von der Behandlung ist keine weitere Steigerung der Aktivierung möglich. Ein ähnliches Bild war auch bei der Betrachtung der CD4-Untergruppen im Kolon der Mäuse erkennbar. Auch hier wurde vor allem die CD4+CD134+ Zellen beeinflusst.

Regulatorische T-Zellen

Ähnlich wie in der Zellkultur war auch *in vivo* eine Erhöhung der CD4+CCR4+ regulatorischen T-Zellen zu beobachten. Jedoch konnte kein Unterschied zwischen den Ergebnissen der Ethanolgruppe und Ethanol + Antigengruppe festgestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass trotz der geringeren Alkoholkonzentration von 30 % spezifische Effekte der Antigene nicht dargestellt werden. Dennoch deutet der Anstieg der regulatorischen T-Zellen auf ein aktiviertes Immunsystem hin, so dass durch die Applikation von Ethanol und Ethanol + Antigen eine Regulation der Immunantwort angeregt wird. Diese ist jedoch durch die ständige T-Zellaktivierung durch Autoantigen nicht ausreichend, um die Inflammation zu regulieren.

Monozyten und Makrophagen

Interessanterweise führte die Behandlung mit Ethanol und Ethanol + Pr3 zu einer Erhöhung der Population der CD14+TSLPR+ Monozyten und der CD11b+TSLPR+ Makrophagen in der Milz, die mit einem akuten Entzündungsgeschehen bei *Colitis ulcerosa* in Verbindung gebracht werden (FOHLINGER et al. 2016). Dies unterstützt die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchung, dass durch die Präsentation von Antigenen das Immunsystem fortlaufend aktiviert wird und die regulatorischen Mechanismen nicht in der Lage sind die Inflammation zu kontrollieren.

Es muss jedoch bedacht werden, dass TSLP speziesspezifisch wirkt (FRANCIS et al. 2016) und murines TSLP nicht an den humanen TSLP-Rezeptor binden kann. Somit kann trotz vorhandenem TSLP keine TH2-Immunreaktion induziert werden, so dass das Gleichgewicht in Richtung der Inflammation verschoben wird. Wie erwartet konnte somit gezeigt werden, dass die Applikation von Autoantigenen die Entstehung einer Entzündung begünstigt.

Des Weiteren zeigte sich bei der Analyse des Kolons ein Anstieg der CD11b+CD1a+ Makrophagen, deren Anteil auch in Kolonproben von Kolitis-Patienten erhöht ist (FOHLINGER et al. 2016). CD1a ist ein Molekül, das vor allem Lipide präsentiert und dem dadurch auch eine Rolle bei der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen zugeschrieben wird (DE JONG et al. 2014). Die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen heißt zwar noch nicht, dass ein

pathologischer Prozess im Sinne einer Autoimmunerkrankung vorliegt, da ein gewisses Maß an Autoreaktivität die Funktionsweise des Immunsystems gewährleistet (COHEN, I. R. u. YOUNG 1991). Der Verlust der regulatorischen Mechanismen und gesteigerte autoreaktive Reaktionen führen jedoch zu der Ausbildung einer Autoimmunität (ABBAS et al. 2004).

Ein erhöhter Anteil der CD11b+CD80/86+ reifen Makrophagen im Kolon unterstützt die Vermutung, dass eine starke Aktivierung des Immunsystems vorliegt. Die CD-Moleküle CD80/86 auf antigenpräsentierenden Zellen binden an ihre Liganden CD28 und CTLA-4 der T-Zellen und aktivieren diese (MUKHERJEE et al. 2002).

Insgesamt scheinen Autoantigene den inflammatorischen Prozess zu unterstützen.

6.4. Ziel IV: Beeinflussung der immunologischen Vorgänge durch die Testung ausgewählter Immunmodulatoren im NSG-Mausmodell

Durch die hochgradige Aktivierung des Immunsystems aufgrund der Präsentation von Autoantigenen, ist die regulatorische Immunantwort nicht ausreichend, um der Entzündungsreaktion entgegenzuwirken.

In vorangegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe zeigte sich, dass durch die Applikation eines anti-CCR4 Antikörpers die Population der CD4+CCR4+ regulatorischen T-Zellen deutlich abnahm und sich die Krankheitssymptome deutlich verschlechterten (Daten nicht aufgeführt). Wenn nun durch die Gabe eines Therapeutikums die regulatorischen Zellen positiv beeinflusst werden könnten, so könnte das immunologische Gleichgewicht in Richtung eines Heilungsprozesses verschoben werden.

Mammalian target of rapamycin (mTOR) ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die das Wachstum und die Proliferation der Zellen beeinflusst (BALLOU u. LIN 2008). Rapamycin oder Sirolimus ist ein natürlich vorkommendes Makrolidantibiotikum, das mTOR und somit die Zellproliferation und das Zellwachstum hemmt. Es ist als immunsuppressiv wirkendes Medikament für die Verhinderung von Transplantatabstoßungen zugelassen (VIGNOT et al. 2005). Des Weiteren fördert Sirolimus die Proliferation der regulatorischen T-Zellen (BATTAGLIA et al. 2012).

In unserem Mausmodell sollte untersucht werden, inwieweit Sirolimus die regulatorischen Zellen beeinflusst und so zu einer Verbesserung der Krankheitssymptome und des Phänotyps führt.

Die Analyse der Hypothesen 4.1-4.3 basiert zunächst auf den Auswertungen des Versuches UC 103, da der Einfluss des immunologischen Hintergrundes des Spenders durch das Aufstellen der Hypothese 4.4 genauer betrachtet wird.

6.4.1. Hypothese 4.1: Auswirkung von Sirolimus auf die klinische Aktivität

Um die Wirkung des mTOR-Inhibitors im NSG-Mausmodell zu testen, erfolgte zur Auslösung der Kolitissymptome die rektale Applikation von 50 % Ethanol. Im Allgemeinen lag in der Ethanolgruppe ein höherer makroskopischer und klinischer Score vor, als in der Ethanol + Sirolimusgruppe. Die Mäuse zeigten lediglich am Tag nach der Gabe von Ethanol einen Gewichtsverlust, der sich innerhalb von zwei Tagen wieder normalisierte.

Betrachtet man die Histologie kam es in der Ethanol + Sirolimusgruppe verglichen mit der Ethanolgruppe zu einer verringerten Zellinfiltration und geringgradigen Ödematisierung.

Das klinische und histologische Bild der Ethanolgruppe entsprach den Ergebnissen früherer Versuche der Arbeitsgruppe. Demnach scheint sich die zusätzliche Gabe von Sirolimus wie angenommen positiv auf den Phänotyp der Krankheit auszuwirken und die Ausbildung der Kolitissymptome zu verhindern.

6.4.2. Hypothese 4.2: Einfluss von Sirolimus auf die Immunzellen

T-Zellen

Die Behandlung der Mäuse mit Sirolimus führte zu einem Anstieg der CD4+CCR4+ Zellpopulation. Dies entspricht dem in der Literatur beschriebenen Effekten des mTOR-Inhibitors auf regulatorische T-Zellen (BATTAGLIA et al. 2012).

Regulatorische T-Zellen in der *Lamina propria* und im lymphatischen Gewebe des gastrointestinalen Traktes sind für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes gegenüber enterischen Antigenen verantwortlich (FONTENOT et al. 2005). Ein Mangel oder eine Fehlfunktion der regulatorischen T-Zellen trägt zur Entstehung intestinaler Entzündungen bei (GEEM et al. 2015). Die Bedeutung der Tregs ist nicht nur für die Pathogenese von Kolitis, sondern auch für Autoimmunerkrankungen und Allergien beschrieben. Tregs sind wesentlich für die Entscheidung zwischen *self* und *non-self* verantwortlich. Fehlt dieser Regulationsmechanismus kommt es zur Ausbildung einer Autoimmunität (SAKAGUCHI 2005).

Die Tatsache, dass die Zahl der regulatorischen Zellen bei Kolitis verringert ist beziehungsweise eine Fehlfunktion vorliegt, spricht für die Beteiligung eines autoimmunen Prozesses. Gleichzeitig könnte Sirolimus hier als Therapeutikum von Nutzen sein, um das Gleichgewicht zugunsten der regulatorischen T-Zellen zu verschieben und so zu helfen die Entzündung zu kontrollieren.

Im Kolon der Mäuse erhöhte sich die Population der CD4+CD134+ Zellen durch die Gabe von Sirolimus geringgradig. Dies kann einerseits für eine generelle Aktivierung des Immunsystems durch Ethanol sprechen. Andererseits kann es auch durch die Tatsache erklärt werden, dass CD134 als Aktivierungsmarker auch von regulatorischen T-Zellen exprimiert wird (SEDDIKI et al. 2014). Somit würde Sirolimus auch die Differenzierung der regulatorischen T-Zellen im Kolon begünstigen.

Monozyten und Makrophagen

Die Auswirkungen auf die CD14+CD1a+ und CD14+TSLPR+ Monozyten in der Milz konnten weder durch Ethanol noch durch Ethanol + Sirolimus deutlich gezeigt werden. Die CD14+CD64+ und CD14+CD163+CD206 Monozyten hingegen stiegen sowohl durch die Behandlung mit Ethanol als auch durch Ethanol + Sirolimus an. Dies deutet auf eine generelle Aktivierung der M1 und M2 Monozyten in Folge des Ethanolreizes hin und zeigt nicht wie erwartet einen spezifischen Effekt durch Sirolimus im Sinne eines Absinkens der Zellpopulationen.

Die Expression der CD11b+CD1a+ Makrophagen in der Milz wurde durch Ethanol beeinflusst, durch die Behandlung mit Sirolimus sank der Anteil der Zellen an der CD11b+ Zellpopulation. Ein ähnliches Verteilungsmuster konnte bei den CD11b+TSLPR+ Makrophagen beobachtet werden. Sowohl die Expression von CD1a als auch von TSLPR deutet auf eine Aktivierung des Immunsystems in Folge des Entzündungsreizes hin. Wie zuvor beschrieben wird CD1a mit der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in Verbindung gebracht (DE JONG et al. 2014). TSLPR wird besonders bei Vorliegen eines akuten Entzündungsgeschehens exprimiert (FOHLINGER et al. 2016). Dass durch Sirolimus der Anteil dieser Zellpopulationen wieder sank, unterstützt die Hypothese, dass Sirolimus die regulatorischen Mechanismen der Immunantwort fördert.

Im Kolon entsprach der Anteil der CD11b+CD1a+ Makrophagen der Sirolimusgruppe annähernd dem der unbehandelten Kontrollgruppe. Selbiges gilt für die CD14+CD1a+ Monozyten. So lässt sich hinsichtlich dieser Zellpopulationen eine Tendenz erkennen, dass durch Sirolimus die mit einer Entzündung assoziierten Zellenfrequenzen abnehmen und die Ergebnisse aus der Milz bestätigen.

6.4.3. Hypothese 4.3: Beeinflussung des Zytokinprofils der NSG-Maus durch Sirolimus

Die Vermutung, dass durch Sirolimus das Gleichgewicht zugunsten der Expression anti-inflammatorischer Zytokine verschoben wird, konnte nicht bestätigt werden. Vielmehr stieg durch die Behandlung mit Ethanol + Sirolimus das pro-inflammatorisch wirkende murine TARC an. Scheinbar kann durch Sirolimus die Entzündung nicht beseitigt werden, die erhöhte Expression von mTARC und die verringerte Expression von IFN γ in der Sirolimusgruppe lassen aber darauf schließen, dass sich die Immunantwort in Richtung einer TH2-Reaktion verschiebt.

Durch die Schädigung des Epithels werden Zytokine freigesetzt, die die Differenzierung der TH2-Zellen fördern. Die Sekretion der TH2 Zytokine fördert einen Wundheilungsprozess und einen Umbau der Gewebestruktur, so dass die Schutzfunktion des Epithels gegenüber Pathogenen wieder verbessert wird. Dennoch wird durch diese strukturellen Umbauvorgänge die ursprüngliche Funktion des Darmes nicht wiederhergestellt, so dass von Funktionseinschränkungen ausgegangen werden kann (JOVANOVIĆ et al. 2014).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich Sirolimus positiv auf die Ausprägung der Krankheitssymptome und den Phänotyp auswirkt. Auf immunologischer Ebene ist zu erkennen, dass die Entzündung nicht beseitigt wird. Vielmehr werden durch die Verschiebung des Gleichgewichtes regulatorische T-Zellen und TH2-Zellen begünstigt, so dass ein Wundheilungsprozess eingeleitet wird. Durch den Einfluss auf die regulatorischen T-Zellen könnte sich die Gabe von Sirolimus auch positiv auf die Behandlung eines autoimmunen Krankheitsgeschehen bei Patienten mit *Colitis ulcerosa* auswirken.

6.4.4. Hypothese 4.4: Beeinflussung des immunologischen Profils durch Sirolimus in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität der Spender

Mit Spender 103 wurde ein Patient gewählt, der mit einem SCCAI von 5 einen leicht erhöhten klinischen Aktivitätsscore aufwies. Wie oben bereits beschrieben, profitierten die Mäuse des Versuches UC 103 durch die Behandlung mit Sirolimus.

Für den Versuch UC 105 wurde ein Spender in Remission mit einem SCCAI von 2 gewählt. Überraschenderweise entwickelten Mäuse der Sirolimusgruppe klinische Symptome. Histologisch waren im Vergleich zu der Ethanolgruppe keine Veränderungen zu beobachten. Die FACS-Analyse hingegen zeigte, dass der Effekt auf die regulatorischen T-Zellen durch Sirolimus weniger ausgeprägt war als bei UC 103. Zusätzlich stieg der Anteil der CD11b+CD1a+ Makrophagen und der CD14+CD1a+ Monozyten und CD14+TSLPR+

Monozyten durch die Gabe von Sirolimus signifikant an. Die CD11b+TSLPR+ Makrophagen waren ebenfalls leicht erhöht. Des Weiteren stieg die Frequenz der CD14+CD64+ Monozyten und der CD14+CD163+CD206+ Monozyten an. Hier wird deutlich, dass Sirolimus nicht wie zuvor vornehmlich auf die regulatorischen Mechanismen einwirkte. Stattdessen konnte eine Erhöhung der inflammatorischen Marker gezeigt werden, welche den zuvor untersuchten Effekten von Ethanol entsprechen (PALAMIDES et al. 2016).

Patient UC 118 wies ebenfalls einen niedrigen Aktivitätsscore von 3 auf, während einer endoskopischen Routineuntersuchung wurden jedoch schwere makroskopische und histologische Veränderungen des Kolons festgestellt. Klinisch und histologisch zeigten sich die Mäuse dieses Versuchs unauffällig. Wie zuvor bei UC 105 stieg auch bei UC 118 die Frequenz der CD4+CCR4+ Zellen nur gering an. Auf die Monozyten- und Makrophagenpopulation konnte kein einheitlicher Effekt festgestellt werden. Die CD11b+CD1a+ und CD11b+TSLPR+ Makrophagen sanken leicht durch die Behandlung mit Sirolimus, CD14+CD1a+ und CD14+TSLPR+ Monozyten stiegen hingegen an. Die CD14+CD64+ und CD14+CD163+CD206+ Monozyten konnten nicht deutlich beeinflusst werden.

Aufgrund unserer Ergebnisse scheint die Reaktion in der Maus von der Krankheitsaktivität des PBMC-Spenders und des jeweiligen immunologischen Profils abzuhängen. Die Mäuse, die mit PBMC eines kranken Spenders rekonstituiert wurden, profitieren demnach von der Behandlung mit Sirolimus. Bei PBMC eines Patienten in Remission hingegen wurde das immunologische Gleichgewicht so beeinflusst, dass keine regulatorischen Mechanismen gefördert wurden. Stattdessen kam es zu einer Erhöhung der inflammatorischen Marker und dem Auftreten einer Entzündungsreaktion.

7 Zusammenfassung

Autoimmunität als wesentlicher Bestandteil des Entzündungsprozesses bei *Colitis ulcerosa*

Colitis ulcerosa und *Morbus Crohn* werden unter dem Begriff der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zusammengefasst. Der Krankheitsverlauf ist durch immer wieder auftretende Entzündungsschübe gekennzeichnet. Blutige Durchfälle und abdominale Krämpfe stellen hierbei typische Symptome dar. Die Kolitis-Patienten sind bei der Diagnosestellung oft sehr jung und durch die Erkrankung in ihrem Alltag stark eingeschränkt. Die lebenslange medikamentöse Therapie ist durch die starken Nebenwirkungen ein weiterer belastender Faktor. Häufig kommt es auch zu der Entwicklung einer medikamentös-therapierefraktären Kolitis. In so einem Fall stellt die chirurgische Resektion des Kolons und des Rektums die letzte therapeutische Maßnahme dar.

Um die Therapieoptionen zu erweitern, ist es unerlässlich, das Verständnis der Krankheit kontinuierlich zu verbessern. Auf immunologischer Ebene ist längst noch nicht genau geklärt, welche Abläufe zu der Entstehung der übersteigerten Immunreaktion führen.

Hier hat sich die Verwendung translationaler Tiermodelle als nützlich erwiesen. In unserem Tiermodell werden NOD-scid IL2R γ -chain^{null} Mäusen (NSG) mit PBMC von *Colitis ulcerosa*-Patienten rekonstituiert. Nach der rektalen Applikation von Ethanol entwickeln NSG-Mäuse Kolitissymptome und pathologische Veränderungen, die die humane Krankheit teilweise abbilden.

Da in Kolitis-Patienten Autoantikörper identifiziert werden konnten, liegt die Beteiligung eines autoimmunen Prozesses nahe. Das Immunsystem wäre bei einer Autoimmunerkrankung nicht mehr in der Lage die Immunreaktion einzufangen und würde so eine chronische Entzündung begünstigen.

In dieser Arbeit konnte zunächst der Einfluss der Autoantigene Pr3 und CD99 auf T-Zellen, Makrophagen und Monozyten *in vitro* gezeigt werden. Der Anstieg pro-inflammatorischer TH17-Zellen sowie der regulatorischen Zellen ließ auf ein hochgradig aktiviertes Immunsystem schließen. In diesem Zusammenhang wurde auch der Anstieg der CD11b+TSLPR+ Makrophagen gesehen, die mit dem Entzündungsprozess in Kolitis-Patienten in Verbindung gebracht wurden.

Die Ergebnisse der Zellkultur konnten im Tiermodell bestätigt werden. Der klinische Aktivitätsscore war durch die Antigengabe erhöht. Die regulatorischen Zellen stiegen ebenfalls an, genauso wie die CD14+TSLPR+ Monozyten und die CD11b+TSLPR+ Makrophagen. Dies deutete auf eine Aktivierung der anti-inflammatorischen Zellen hin. Ein Mangel an TSLP, das zur Unterdrückung der pro-inflammatorischen Antwort benötigt wird, könnte in Gegenwart von Autoantigenen eine TH1-Antwort und somit eine akute Inflammation begünstigen. Das Bild des entzündlichen Geschehens konnte somit erklärt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in dem Mausmodell die pathologischen Veränderungen durch die Ausbildung einer Autoimmunität verstärkt werden.

Um diese These zu unterstützen, wurde das Therapeutikum Sirolimus getestet. Der mTOR-Inhibitor Sirolimus ist für die Behandlung von Transplantatabstoßungsreaktionen zugelassen und fördert die Differenzierung regulatorischer T-Zellen. Im NSG-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die PBMC eines kranken Spenders erhielten, von der Behandlung mit Sirolimus profitierten. Die klinische Aktivität ähnelte der unbehandelten Kontrollgruppe. Dies ist vermutlich auf die verstärkte Differenzierung der regulatorischen Zellen zurückzuführen, die in den behandelten Tieren beobachtet wurde. Es war aber auch ersichtlich, dass Sirolimus die Entzündung nicht vollständig eliminierte. Vielmehr verschob sich das Gleichgewicht in Richtung einer TH2-Antwort, die den Wundheilungsprozess begünstigte.

Interessanterweise konnte auch eine Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität des Spenders gezeigt werden. Wurden die Mäuse mit PBMC von Spendern in Remission rekonstituiert, zeigte sich ein anderes immunologisches Bild. Hier kam es zu keinem Anstieg der regulatorischen Zellen, stattdessen wurde eine Erhöhung der inflammatorischen Marker beobachtet.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Autoimmunität ein wichtiger Faktor des Entzündungsprozesses ist und dass das immunologische Gleichgewicht durch Beförderung der regulatorischen Zellen wiederhergestellt werden kann. Somit könnte Sirolimus zur unterstützenden Behandlung im akuten Krankheitsschub geeignet sein. Wie die Ergebnisse mit einem Spender in Remission zeigten, wäre eine remissionserhaltende Therapie mit Sirolimus nicht angebracht.

8 Summary

Autoimmunity as a driving force of inflammation in ulcerative colitis

Ulcerative colitis and Crohn's disease belong to the complex of inflammatory bowel disease. Reoccurring inflammatory flares characterize the course of the disease. Typical symptoms include abdominal cramps and bloody diarrhoea. Patients are often very young when the diagnosis is made. Due to the chronicity of the disease they are restricted in their daily life and require lifelong therapy. If patients are refractory to medicinal treatment surgical resection of the colon and rectum is the last option.

To improve therapy it is essential to further enhance our understanding regarding the immunological mechanisms.

Translational animal models have proven to be an important tool to study human immunology. In our animal model NOD-scid IL2R γ -chain^{null} mice (NSG) are engrafted with PBMC from colitis patients. Mice are then challenged rectally with ethanol and develop colitis symptoms. Their humanized immune system allows us to study human immunological mechanisms.

Because autoantibodies could be identified in ulcerative colitis patients it is possible that autoimmunity plays a role in the pathogenesis of the disease. Due to the immune system being unable to control the inflammation, autoimmunity might lead to a breach of tolerance and therefore the development of a chronic inflammation.

This thesis focused on the question how autoantigens influence the immunological profile. First the autoantigens Pr3 and CD99 were tested *in vitro*. The increase of pro-inflammatory TH17 cells, regulatory T-cells and CD11b+TSLPR+ macrophages suggested a highly activated immune system.

In vitro results were confirmed in our NSG mouse model. Autoantigens led to an elevated clinical activity score and an increase of CD14+TSLPR+ monocytes, CD11b+TSLPR+ macrophages and regulatory T-cells. Lack of TSLP additionally favours a TH1-response. All in all the aggravation of an inflammatory process because of autoantigens was verified.

In previous experiments the application of an anti-CCR4 antibody resulted in a decrease of regulatory T-cells. Hence it should be clarified how the regulatory immune response could be positively influenced to help control the inflammation.

Sirolimus is an inhibitor of mTOR that is approved for the treatment of transplant rejections. Furthermore it promotes regulatory T-cell differentiation. Mice engrafted with PBMC from a donor with a high clinical activity score benefited from treatment with sirolimus. Mice showed no clinical symptoms and the frequency of regulatory T-cells increased. But the inflammation could not be eliminated: The immunological balance was shifted towards a TH2 response that promotes wound healing.

A positive effect of sirolimus seems to depend on the donor. Mice engrafted with PBMC from patients in remission did not benefit from treatment with sirolimus. The regulatory T-cells were not elevated, but inflammatory markers increased.

Based on our results sirolimus improves symptoms of ulcerative colitis. Because of its influence on regulatory T-cells and against the background of an autoimmunological process sirolimus could be used as an additional treatment to help control an acute inflammatory flare. It is probably not suitable as a sole therapy for maintaining remission.

9 Anhang

9.1. Gatingstrategie

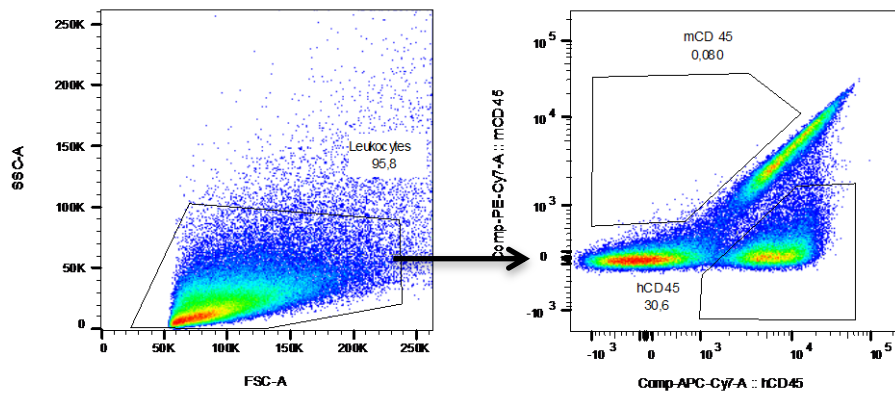


Abbildung 35:: Gatingstrategie der Auswertung der murinen und humanen CD45+ Zellen.

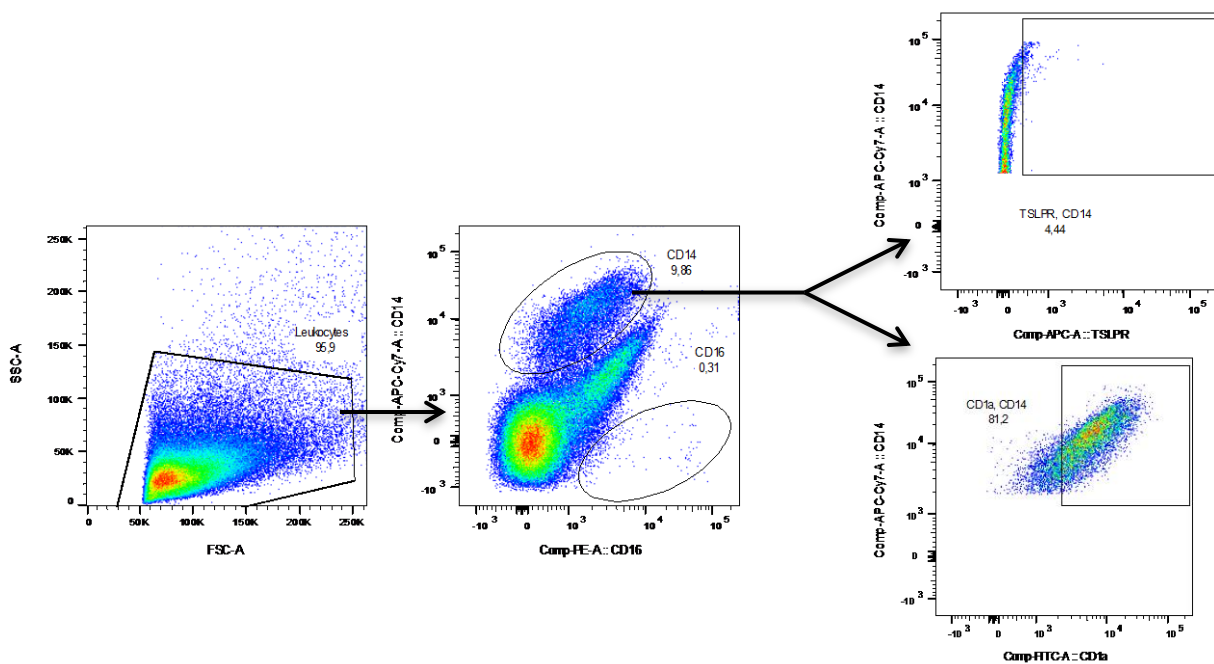


Abbildung 36: Gatingstrategie der Auswertung der CD14+TSLPR+ Zellen und CD14+CD1a+ Zellen.

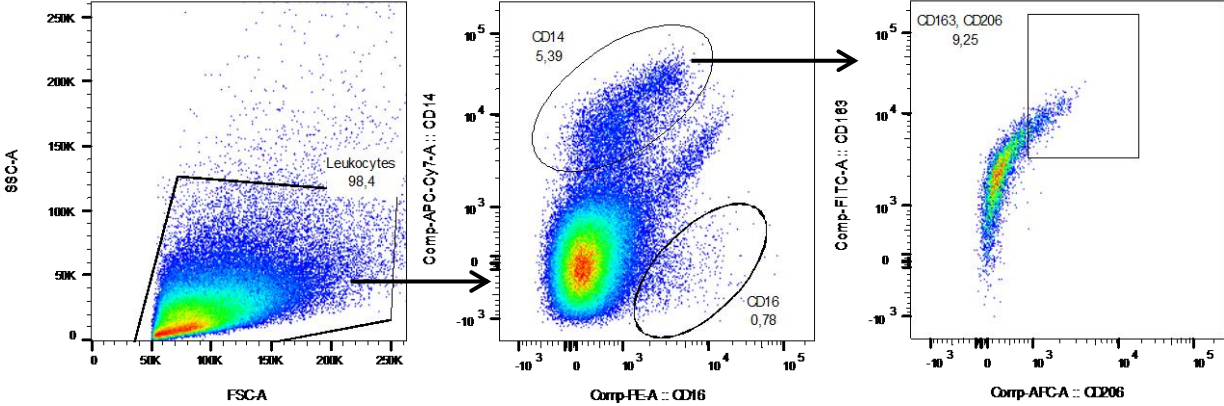


Abbildung 37: Gatingstrategie der Auswertung der CD14+CD163+CD206+ Zellen.

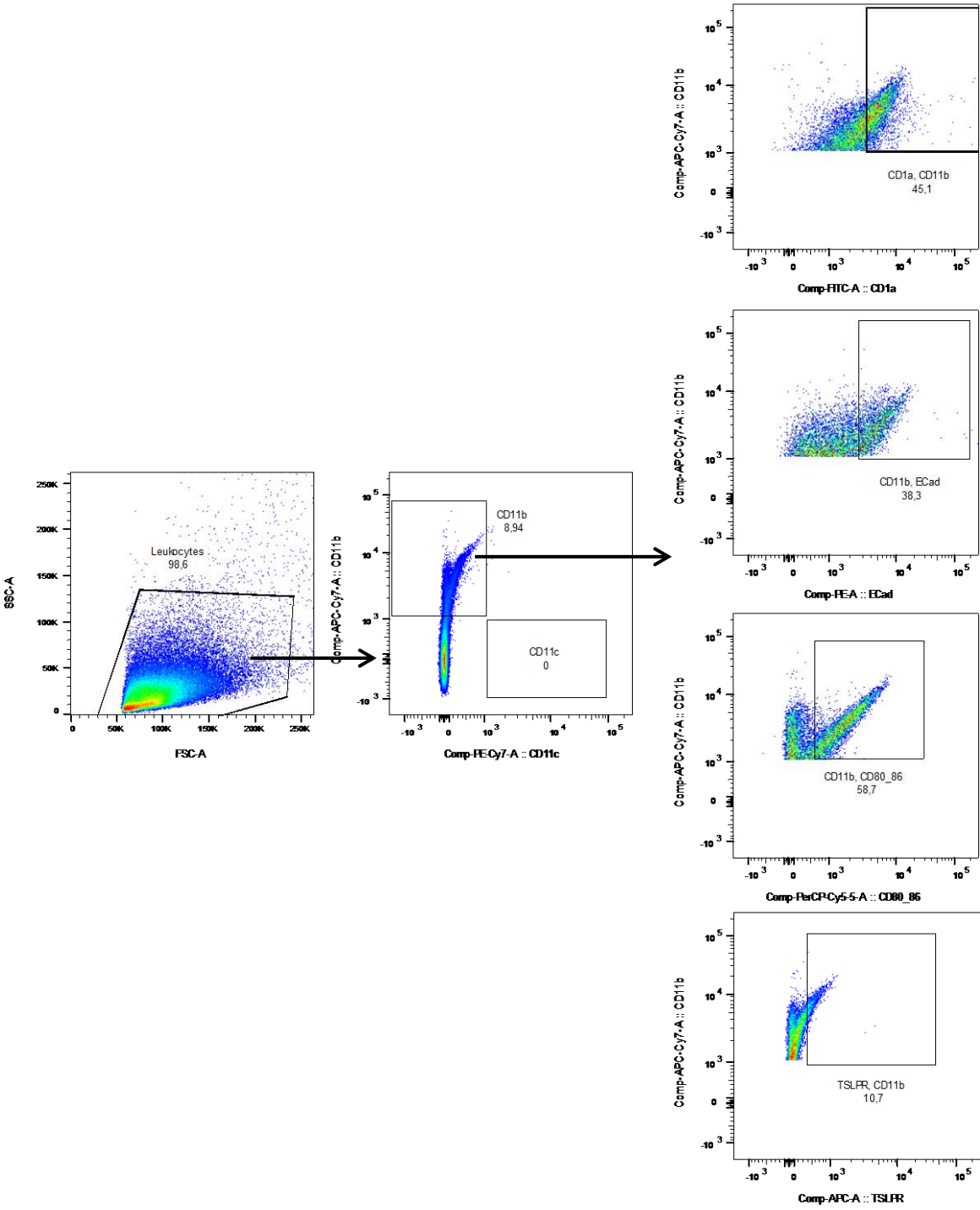


Abbildung 38: Gatingstrategie der Auswertung der CD11b+CD1a+, CD11b+TSLPR+, CD11b+E-Cadherin+, D11b+CD80/86+ Zellen.

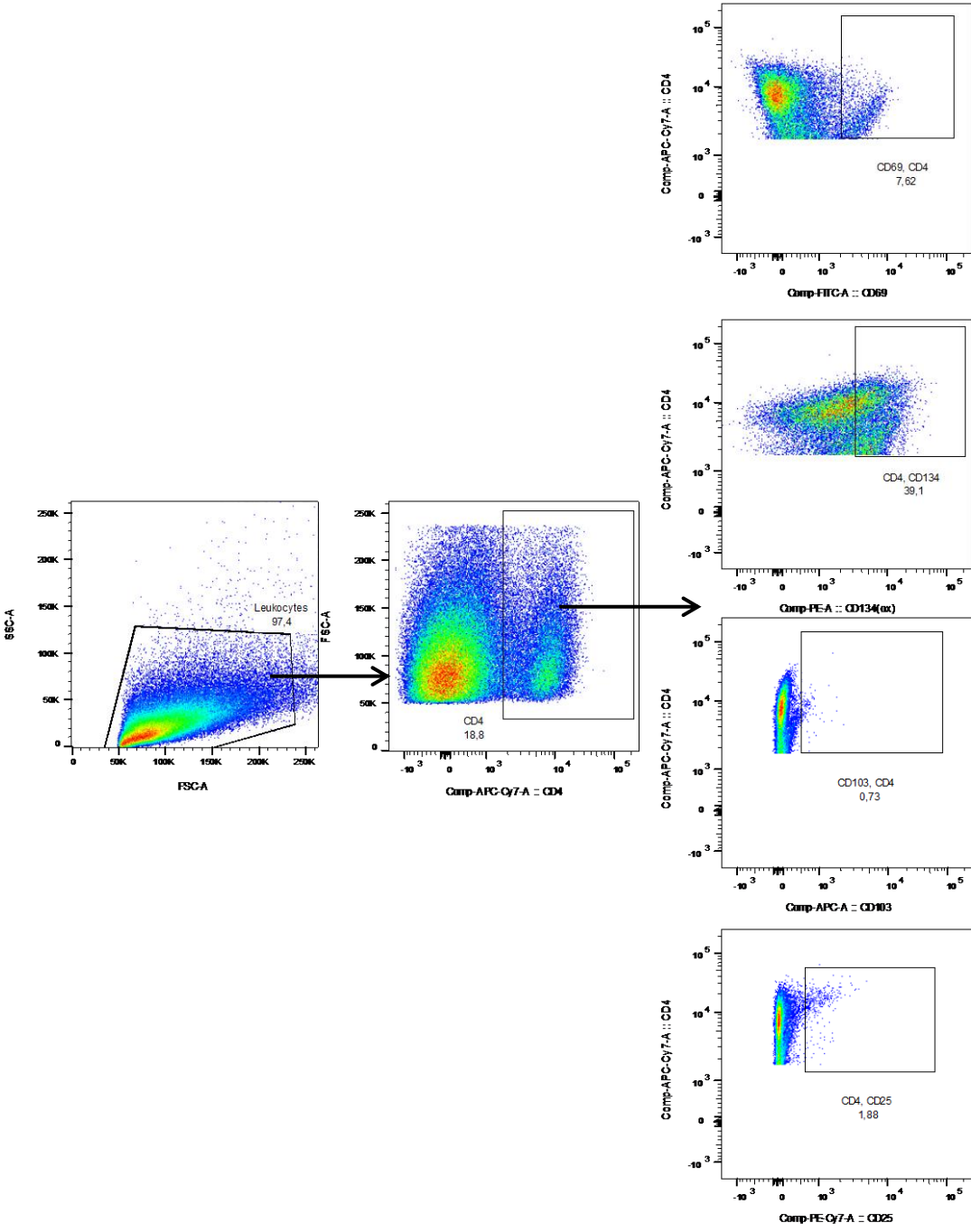


Abbildung 39: Gatingstrategie der Auswertung der CD4+CD69+, CD4+CD134+, CD4+103+, CD4+CD25+ Zellen

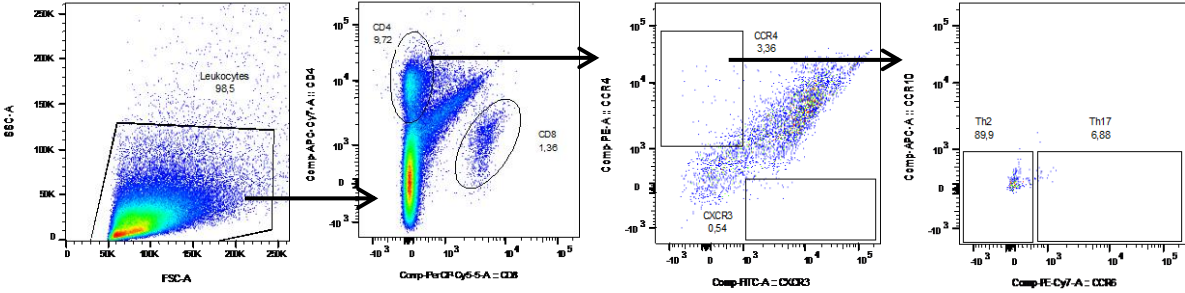


Abbildung 40: Gatingstrategie der Auswertung der CD4+CCR4+ und TH17 Zellen (CD4+CCR4+CCR6+).

9.2. FACS-Antikörper

Tabelle 11: Antikörper der FACS-Analyse im Detail; T=T-Zelle, B=B-Zelle, DC=dendritische Zelle, Mo=Monozyt, Ma=Makrophage, NKT=natürliche Killer T-Zellen, NK=natürliche Killerzellen. Falls nicht anders angegeben, handelt es sich ausschließlich um die humanen Antikörper.

Marker	Expression	Aufgabe	Farbe	Klon	Isotyp
CD45	Leukozyten	B-, T-Zellaktivierung, Signaltransduktion	APC Cy 7	2D1	IgG1
mCD45	Leukozyten	B-, T-Zellaktivierung, Signaltransduktion	PE Cy 7	30-F11	IgG2b
CD4	T, Mo, Ma	Ko-Rezeptor für MHC-II-Moleküle	APC Cy 7	OKT4	IgG2b
CD69	Aktivierte Leukozyten, Mo, Ma	Frühes Aktivierungsantigen	FITC	FN50	IgG1
CD25	Aktivierte T+B, NK, Ma	α -Kette des IL-2 Rezeptors	PE Cy 7	BC96	IgG1
CD127	T,B	IL-7 R α -Kette	PerCP Cy 5	A019D5	IgG1
CD103	Intraepitheliale Lymphozyten	α E-Integrin (Ligand für E-Cadherin)	APC	Ber-ACT8	IgG1
CD134	Aktivierte T	T-Zellaktivierung, Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Adäsion	PE	ACT35	IgG1
CCR4	Lymphozyten	Rezeptor für TARC (CCL17)	PE	L291H4	IgG1
CCR6	DC, T	Migration von T-Zellen, B-Zellreifung	PE Cy 7	G034E3	IgG2b
CD11b	Mo, Ma, NK, T+B, DC	Adhäsion, Chemotaxis, Apoptose	APC Cy 7	ICRF44	IgG1
CD1a	Thymozyten, DC	Präsentation von Lipidantigenen	Biotin/FITC	HI149	IgG1
TSLPR	T+B, NKT	Rezeptor für TSLP	APC	1B4	IgG1
CD80/86	Aktivierte T+B, Ma, DC	Kostimulierung	PerCP Cy 5	IT2.2	IgG1
E-Cadherin	Epithelzellen	Epithelzellrezeptor	PE	67A4	IgG1
CD14	Mo, Ma	Rezeptor für den Komplex aus LPS und LPB	APC Cy 7	HCD14	IgG1
CD163	Mo, Ma	Endozytose	FITC	GHI/61	IgG1
CD206	Mo, Ma, Endothelzellen	Endozytose	APC	15.2	IgG1
CCR2	Mo, B+T, DC	Leukozyten Chemotaxis	PE Cy 7	K036C2	IgG2a

9.3. Tabellen zur statistischen Auswertung

PBMC

Tabelle 12: Statistische Werte für die Auswertung der PBMC, Gruppe A=Gesund; B=UC102; C=UC103;D=UC104; E=UC105; F=UC118. Es wurde von einem Konfidenzintervall von 95% ausgegangen.

	Gesund (A)			UC102 (B)			UC103 (C)			UC104 (D)			UC105 (E)			UC118 (F)		
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N
CD4+	19,42	7,54	4	31	N/A	1	49,30	N/A	1	45,4	N/A	1	49,5	N/A	1	4,47	N/A	1
CD11b+	3,33	1,09	4	10,40	N/A	1	20,10	N/A	1	8,00	N/A	1	25,80	N/A	1	10,90	N/A	1
CD14+	4,96	1,45	4	11,40	N/A	1	19,30	N/A	1	15,20	N/A	1	27,60	N/A	1	10,50	N/A	1

Tabelle 13: p-Werte der PBMC Auswertung

	p
CD11b+	B-A=0,04; C-A=0,003; E-A=0,001; F-A=0,03; C-B=0,03; E-B=0,01; D-C=0,02; F-C=0,04; E-D=0,006;F-E=0,01
CD14+	C-A=0,01; D-A=0,03; E-A=0,003; E-B=0,02; E-D=0,04; F-E=0,01

Zellkultur

Tabelle 14: Statistische Werte für die Analyse der *in vitro* Versuche. Gruppe A=Kontrolle, Gruppe B=PHA, Gruppe C=Pr3, Gruppe D=CD99. Es wurde von einem Konfidenzintervall von 95 % ausgegangen.

	Kontrolle (A)			PHA (B)			Pr3 (C)			CD99 (D)			p
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	
CD4+	28,61	18,13	6	35,79	15,15	9	37,90	18,22	8	37,50	6,81	3	
CD4+CD69+	41,73	28,59	6	41,03	7,61	9	30,60	4,68	8	13,22	4,04	3	D-B=0,04
CD4+CD134+	21,69	12,15	6	42,77	8,34	9	32,55	5,14	8	17,03	4,31	3	B-A=0,0004; D-B=0,0006
CD4+	34,35	17,04	6	34,78	15,31	9	35,95	17,82	8	36,10	3,05	3	
CD4+CCR4+	17,07	1,91	6	12,81	1,55	9	15,12	2,56	8	18,97	0,80	3	B-A=0,002; D-B=0,0005; D-C=0,04
CD4+CCR4+CCR6+	16,63	3,22	6	15,07	3,33	9	19,52	4,40	8	14,70	1,25	3	
CD11b+	8,36	6,92	5	10,30	6,00	8	11,58	9,47	7	14,70	5,91	3	
CD11b+TSLPR+	2,95	3,25	5	2,26	1,50	8	2,53	0,94	7	6,84	4,05	3	D-B=0,03
CD14+	10,22	6,10	6	13,52	7,35	9	11,70	7,59	8	17,37	4,84	3	
CD14+TSLPR+	6,03	3,99	6	3,73	3,24	9	7,71	3,97	8	10,08	5,32	3	

Versuche UC 102 und UC 104 - Milz

Tabelle 15: Statistische Werte für die Analyse der Effekte der Antigene in der Milz. Gruppe A=Kontrolle, Gruppe B=Ethanol, Gruppe C= Ethanol + Pr3, Gruppe D=Ethanol + CD99. Es wurde von einem Konfidenzintervall von 95 % ausgegangen.

	Kontrolle (A)			Ethanol (B)			Pr3 (C)			CD99 (D)			p
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	
Klinischer Score	0,00	0,00	8	2,50	1,60	8	5,25	3,09	4	4,25	1,49	8	B-A=0,02; C-A=0,0001; D-A=0,0001; C-B=0,04 B-A=0,005; D-A=0,00001 D-B=0,04 B-A=0,01; C-A=0,002
Makroskopischer Score	0,62	0,52	8	0,62	0,74	8	1,00	0,00	4	0,87	0,99	8	
Histologischer Score	0,25	0,46	8	2,12	0,64	8	1,75	1,50	4	3,25	1,16	8	
hCD45	6,01	5,28	8	10,43	13,79	7	11,97	10,39	4	7,25	9,45	8	
mCD45	0,33	0,30	8	0,07	0,04	7	0,30	0,23	4	0,47	0,35	8	
CD4+	10,61	3,72	7	17,28	6,94	8	14,17	3,81	4	10,76	4,94	8	
CD4+CD69+	38,36	18,42	7	25,89	18,41	8	28,97	14,75	4	32,64	14,97	8	
CD4+CD134+	27,87	22,74	7	49,27	25,41	8	35,82	25,33	4	36,72	18,07	8	
CD14+	10,55	3,67	8	8,20	1,60	8	9,07	1,47	4	7,57	2,10	8	
CD14+TSLPR+	6,99	2,18	8	9,27	3,77	8	11,27	1,65	4	8,27	1,61	8	
CD14+	10,03	2,03	8	8,32	0,77	8	10,72	2,11	4	7,99	2,14	8	
CD14+CD163+CD206+	2,15	0,77	8	2,00	0,85	8	3,58	0,70	4	2,39	1,75	8	
CD11b+	6,71	2,42	8	4,77	1,05	8	6,25	1,57	4	4,62	1,35	8	
CD11b+TSLPR+	5,65	1,31	8	9,26	3,00	8	10,93	1,08	4	7,65	1,97	8	

Versuche UC 102 und UC 104 – Kolon

Tabelle 16: Statistische Werte für die Analyse der Effekte der Antigene im Kolon. Gruppe A=Kontrolle, Gruppe B=Ethanol, Gruppe C= Ethanol + Pr3, Gruppe D=Ethanol + CD99. Es wurde von einem Konfidenzintervall von 95 % ausgegangen.

	Kontrolle (A)			Ethanol (B)			Pr3 (C)			CD99 (D)			p
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	
CD4+	40,30	41,72	2	36,25	45,93	2	78,10	N/A	1	45,45	42,92	2	
CD4+CD25+	4,03	4,83	2	1,98	0,20	2	6,94	N/A	1	4,54	1,53	2	
CD4+CD69+	3,98	5,34	2	2,09	2,07	2	1,30	N/A	1	4,36	5,57	2	
CD4+CD103+	3,30	3,81	2	3,34	2,25	2	3,90	N/A	1	5,00	4,76	2	
CD4+CD134+	8,94	11,39	2	6,07	3,75	2	14,30	N/A	1	12,96	9,80	2	
CD4+CD25+CD127 ^{low}	0,26	0,35	2	0,02	0,03	2	0,21	N/A	1	0,08	0,10	2	
CD11b+	4,73	4,38	2	4,99	5,48	2	13,40	N/A	1	10,19	4,67	2	
CD11b+CD1a+	19,92	20,05	2	8,84	8,00	2	46,90	N/A	1	37,10	15,70	2	
CD11b+CD80/86+	10,45	0,92	2	16,70	0,14	2	18,70	N/A	1	10,70	10,74	2	
CD11b+E-Cadherin+	13,97	17,29	2	4,58	4,69	2	6,83	N/A	1	13,10	10,04	2	
CD11b+TSLPR+	13,20	8,05	2	12,50	1,84	2	13,00	N/A	1	17,05	2,76	2	
CD14+	26,19	28,30	2	32,15	41,07	2	55,10	N/A	1	35,25	28,64	2	
CD14+CCR2+	2,21	1,43	2	4,62	5,34	2	19,00	N/A	1	6,18	5,96	2	
CD14+CD1a+	2,78	3,13	2	1,71	1,78	2	23,40	N/A	1	16,50	8,34	2	
CD14+CD80/86+	13,85	6,99	2	26,26	29,04	2	45,60	N/A	1	22,55	18,45	2	
CD14+TSLPR+	5,22	2,78	2	13,95	13,93	2	24,10	N/A	1	11,22	4,20	2	

Versuch UC 103 – Milz

Tabelle 17: Statistische Werte für die Analyse der Effekte der Antigene in der Milz. Gruppe A=Kontrolle, Gruppe B=Ethanol, Gruppe C= Ethanol + Sirolimus. Es wurde von einem Konfidenzintervall von 95 % ausgegangen.

	Kontrolle (A)			Ethanol (B)			Sirolimus (C)			p
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	
Klinischer Score	2,25	1,26	4	15,17	5,67	6	3,17	1,94	6	B-A=0,0003; C-B=0,0002
Makroskopischer Score	0,00	0,00	4	3,80	2,59	5	1,00	1,00	5	
Histologischer Score	0,75	0,96	4	4,20	2,95	5	1,83	3,06	6	
hCD45	30,87	12,87	6	17,67	18,16	5	7,02	3,71	6	C-A=0,02
mCD45	0,03	0,01	4	0,00	0,00	5	0,01	0,00	6	
CD4+	12,69	4,41	4	8,87	8,08	5	6,44	1,95	6	
CD4+CCR4+	1,11	0,35	4	1,98	1,12	5	3,71	1,34	6	C-A=0,008
CD11b+	4,37	0,62	4	6,59	3,10	5	7,53	1,19	6	
CD11b+CD1a+	47,10	4,08	4	53,92	18,35	5	56,61	2,05	6	
CD11b+TSLPR+	5,26	1,82	4	7,68	3,61	5	4,55	1,75	6	
CD14+	2,66	1,48	4	5,54	0,32	5	6,35	1,65	6	B-A=0,01; C-A=0,002
CD14+CD1a+	22,42	2,30	4	38,30	22,24	5	41,60	15,79	6	
CD14+TSLPR+	0,06	0,05	4	0,02	0,02	5	0,04	0,03	6	
CD14+CD64+	9,60	4,15	4	12,68	7,03	5	16,25	3,80	6	
CD14+CD163+CD206+	2,27	0,96	4	5,72	2,40	5	5,90	1,56	6	B-A=0,03; C-A=0,02

Versuch UC 105 – Milz

Tabelle 18: Statistische Werte für die Analyse der Effekte der Antigene in der Milz. Gruppe A=Kontrolle, Gruppe B=Ethanol, Gruppe C= Ethanol + Sirolimus. Es wurde von einem Konfidenzintervall von 95 % ausgegangen.

	Kontrolle (A)			Ethanol (B)			Sirolimus (C)			p
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	
Klinischer Score	0,00	0,00	4	3,00	3,16	6	3,80	3,70	6	
Makroskopischer Score	0,00	0,00	4	1,33	1,86	6	1,44	2,07	5	
Histologischer Score	0,50	0,58	4	2,50	2,34	6	1,60	1,14	5	
hCD45	4,58	4,68	4	4,98	6,36	6	3,63	1,34	5	
mCD45	0,005	0,007	4	0,0003	0,0008	6	0,005	0,004	5	
CD4+	3,99	1,24	4	7,04	3,87	6	4,67	1,82	5	
CD4+CCR4+	2,47	1,21	4	1,42	1,02	6	2,48	0,93	5	
CD11b+	8,81	0,61	4	9,15	1,97	6	7,94	2,36	5	
CD11b+CD1a+	69,50	4,95	4	62,53	2,20	6	76,94	2,62	5	B-A=0,01; C-A=0,01; C-B=0,00002
CD11b+TSLPR+	6,56	2,01	4	4,98	1,36	6	6,59	1,36	5	
CD14+	3,70	0,75	4	4,26	0,83	6	3,95	1,67	5	
CD14+CD1a+	39,25	9,37	4	34,45	7,64	6	54,40	9,24	5	C-B=0,01
CD14+TSLPR+	0,53	0,17	4	0,47	0,21	6	1,07	0,39	5	C-A=0,03; C-B=0,01
CD14+CD64+	12,42	3,45	4	13,37	5,39	6	18,74	3,13	5	
CD14+CD163+CD206+	9,85	2,56	4	9,86	6,44	6	16,45	4,07	5	

Versuch UC 118 - Milz

Tabelle 19: Statistische Werte für die Analyse der Effekte der Antigene in der Milz. Gruppe A=Kontrolle, Gruppe B=Ethanol, Gruppe C= Ethanol + Sirolimus. Es wurde von einem Konfidenzintervall von 95 % ausgegangen.

	Kontrolle (A)			Ethanol (B)			Sirolimus (C)			p
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	
Klinischer Score	1,25	0,5	4	5,00	4,10	6	1,33	0,52	6	B-A=0,01; C-B=0,03
Makroskopischer Score	0,75	0,50	4	1,80	1,09	5	1,00	0,00	6	
Histologischer Score	0,50	0,58	4	2,20	0,44	5	0,83	0,98	6	
hCD45	29,95	19,75	4	32,48	19,19	5	28,46	18,20	6	
mCD45	0,03	0,03	4	0,009	0,01	5	0,01	0,02	6	
CD4+	2,03	1,53	4	3,36	1,80	5	3,82	2,60	6	
CD4+CCR4+	1,19	1,12	4	0,55	0,39	5	2,69	2,50	6	
CD11b+	5,47	2,07	4	6,55	3,52	5	6,08	1,89	6	
CD11b+CD1a+	53,57	6,97	4	69,42	9,61	5	62,17	10,44	6	
CD11b+TSLPR+	7,99	1,29	4	9,42	3,96	5	6,25	3,00	6	
CD14+	5,15	1,49	4	3,57	0,73	5	3,98	2,25	6	B-A=0,0006; C-A=0,0007
CD14+CD1a+	10,16	2,81	4	49,32	10,80	5	47,30	14,27	6	
CD14+TSLPR+	0,19	0,11	4	0,33	0,27	5	0,50	0,39	6	
CD14+	4,43	1,96	4	3,06	0,49	5	3,23	2,41	6	
CD14+CD64+	6,58	5,36	4	15,71	10,59	5	12,66	8,15	6	
CD14+CD163+CD206+	3,10	5,60	4	11,35	13,01	5	10,08	6,20	6	

Versuch UC 103, UC 105 und UC 118 - Kolon

Tabelle 20: Statistische Werte für die Analyse der Effekte der Antigene im Kolon. Gruppe A=Kontrolle, Gruppe B=Ethanol, Gruppe C= Ethanol + Sirolimus. Es wurde von einem Konfidenzintervall von 95 % ausgegangen.

	Kontrolle (A)			Ethanol (B)			Sirolimus (C)			p
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	
CD4+	16,87	5,98	3	24,93	1,60	3	40,50	8,20	2	
CD4+CD69+	34,37	10,23	3	45,70	18,72	3	43,15	0,35	2	
CD4+CD103+	12,86	2,64	3	29,83	11,21	3	38,10	23,33	2	
CD4+CD134+	51,10	22,95	3	67,63	7,28	3	82,20	6,08	2	
CD4+CD25+CD127 ^{low}	1,92	1,64	3	0,97	0,84	3	0,44	0,36	2	
CD11b+	3,69	3,42	3	5,13	6,02	3	6,95	1,56	2	
CD11b+CD1a+	100,00	0,00	3	71,43	49,30	3	99,95	0,70	2	
CD11b+CD80/86+	3,30	3,32	3	18,77	28,43	3	12,89	17,83	2	
CD11b+E-Cadherin+	33,68	57,26	3	33,85	57,29	3	8,98	12,61	2	
CD11b+TSLPR+	3,00	4,03	3	10,25	14,15	3	15,14	20,87	2	
CD14+	6,61	2,30	3	4,45	2,53	3	5,65	0,53	2	
CD14+CD1a+	77,70	38,01	3	89,07	18,25	3	70,40	41,44	2	
CD14+TSLPR+	15,28	9,39	3	17,30	15,03	3	17,75	8,13	2	
CD14+CD80/86+	22,36	16,36	3	24,06	19,74	3	21,15	15,34	2	

Versuch UC 103 - Zytokine

Tabelle 21: Statistische Werte für die Analyse der Zytokinexpression des Versuches UC 103. Gruppe A=Kontrolle, Gruppe B=Ethanol, Gruppe C= Ethanol + Sirolimus. Es wurde von einem Konfidenzintervall von 95 % ausgegangen.

	Kontrolle (A)			Ethanol (B)			Sirolimus (C)			p
	mean	SD	N	mean	SD	N	mean	SD	N	
mTARC	0,07	0,07	4	0,04	0,01	5	0,08	0,02	6	
HGF	0,1	0,04	4	0,09	0,02	5	0,09	0,02	6	
mTGFβ	0,06	0,04	4	0,05	0,01	5	0,05	0,01	6	
IFNγ	0,03	0,03	3	0,17	0,22	4	0,003	0,002	3	

Versuch UC 105 - Zytokine

Tabelle 22: Statistische Werte für die Analyse der Zytokinexpression des Versuches UC 105. Gruppe A=Kontrolle, Gruppe B=Ethanol, Gruppe C= Ethanol + Sirolimus. Es wurde von einem Konfidenzintervall von 95 % ausgegangen.

	Kontrolle (A)			Ethanol (B)			Sirolimus (C)			p
	mean	SD	N	mean	SD	N	mean	SD	N	
mTARC	0,07	0,03	4	0,03	0,01	6	0,06	0,04	5	
HGF	0,08	0,08	4	0,12	0,04	6	0,18	0,10	5	
mTGFβ	0,04	0,01	4	0,05	0,01	6	0,06	0,04	5	
IFNγ	0,01	0,01	4	0,001	0,003	6	0,001	0,003	5	

9.4. R-Skripte

Boxplot

```
##### laden der Pakete #####

if (!require("XLConnect")) {install.packages("XLConnect", dependencies = TRUE)
  options(java.parameters = "-Xmx1024m") library(XLConnect) }
if (!require("lattice")) {install.packages("lattice", dependencies = TRUE)
  library(lattice) }
#Indicate the directory for input files
input_directory = "Dateipfad"
#Indicate the file name to be processed
file_name1 = "Dateiname.xlsx"

##### laden der Daten #####

input_file1 = readWorksheet(loadWorkbook(file.path(input_directory, file_name1)), sheet
  = 1, startRow = 1)
df1 <- as.data.frame(input_file1[,3:104])
View(df1)

##### als pdf speichern #####

pdf("Dateipfad.pdf")

##### Boxplot #####

df1$Behandlung <- factor(df1$Behandlung, levels = c("Kontrolle", "Ethanol", "Pr3",
  "CD99"))

bwplot(df1$CD11b_CD1a ~ df1$Behandlung, horizontal=FALSE, border="black", scales = list
(x = list(rot=45), cex=1.5), xlab="", ylab=list(label="CD1a [%CD11b]", fontsize=20),
par.settings = list(box.dot = list(rep("black",3)), list(plot.symbol = list(pch = 2, col
= "red", cex = 4)), superpose.line = list(col=c("black")), box.umbrella =
list(col=c("black")), box.rectangle = list(fill=c("white"),
col=c("black")), panel=function(x,...,col)
{panel.bwplot(x,...,col=col[packet.number()])}),trellis.par.set(list(plot.symbol =
list(pch = 1, col = "black", cex = .5))))
dev.off()
```

Boxplot Gruppenvergleich

```
##### laden der Pakete #####

if (!require("XLConnect")) {install.packages("XLConnect", dependencies = TRUE)
  options(java.parameters = "-Xmx1024m") library(XLConnect) }
if (!require("lattice")) {install.packages("lattice", dependencies = TRUE)
  library(lattice) }
#Indicate the directory for input files
input_directory = "Dateipfad"
#Indicate the file name to be processed
file_name1 = "Dateiname"

##### laden der Daten #####

input_file1 = readWorksheet(loadWorkbook(file.path(input_directory, file_name1)), sheet
  = 3, startRow = 1)
df1 <- as.data.frame(input_file1[,3:8])
View(df1)
##### als pdf speichern #####

pdf("Dateipfad.pdf")

##### Boxplot #####

df1$Behandlung <- factor(df1$Behandlung, levels = c("Kontrolle", "Ethanol",
  "Sirolimus"))
```

```

bwplot(df1$Histo ~ df1$Behandlung | df1$Donor, horizontal=FALSE, border="black",
layout=c(3,1), scales = list(x = list(rot=45), cex=1.3), ylab=list(label="Histo Score",
fontsize=15), xlab="", par.settings = list(box.dot = list(rep("black",3)),
list(plot.symbol = list(pch = 2, col = "red", cex = 4)), superpose.line =
list(col=c("black")), box.umbrella = list(col=c("black")), box.rectangle =
list(fill=c("white"), col=c("black")), panel=function(x,...,col)
{panel.bwplot(x,...,col=col[packet.number()])}),trellis.par.set(list(plot.symbol =
list(pch = 1, col = "black", cex = 0.7))))

dev.off()

```

Barchart

```

##### laden der Pakete #####

if (!require("ggplot2")) {install.packages("ggplot2", dependencies = TRUE)
library(ggplot2) }
if (!require("RColorBrewer")) {install.packages("RColorBrewer", dependencies = TRUE)
library(ggplot2) }
if (!require("XLConnect")) {install.packages("XLConnect", dependencies = TRUE)
options(java.parameters = "-Xmx1024m")
library(XLConnect) }
if (!require("reshape2")) {install.packages("reshape2", dependencies = TRUE)
library(reshape2)}
#Indicate the directory for input files
input_directory = "Dateipfad"

#Indicate the file name to be processed
file_name1 = "Dateiname.xlsx"

##### laden der Daten #####

input_file1 = readWorksheet(loadWorkbook(file.path(input_directory, file_name1)), sheet
= 1, startRow = 1)
df1 <- as.data.frame(input_file1)
df1sub <- subset(df1, select = c(Behandlung, CD4_CD69, CD4_CD103, CD4_CD134,
CD25_CD127))
View(df1sub)
colnames(df1sub)[2:5] <- c("CD4+ CD69+", "CD4+ CD103+", "CD4+ CD134+", "CD4+
CD25+CD127+")
means<-aggregate(df1sub[,2:5],by=list(df1sub$Behandlung),mean)
colnames(means)[1] <- "Behandlung"
View(means)
means.long<-melt(means,id.vars="Behandlung")
View(means.long)
sd <- aggregate(df1sub[,2:5], by=list(df1sub$Behandlung), sd)
colnames(sd)[1] <- "Behandlung"
View(sd)
sd.long <- melt(sd, id.vars="Behandlung")
View(sd.long)
limits <- aes(ymin = value - sd, ymax=value + sd)
##### als pdf speichern #####

pdf("Dateipfad.pdf")

##### Boxplot #####

p <- ggplot(data=means.long, aes(x = variable, y = value, fill=factor(Behandlung,
levels = c("Kontrolle", "Ethanol", "Ethanol+Sirolimus"))))
cbPalette <- c("#99CCFF", "#6699CC", "#336699")
p + geom_bar(stat = "identity", position = "dodge", width = 0.5) + labs(y="CD4 [Frequenz
in %]", x=element_blank()) + scale_fill_manual(values=cbPalette, name="Behandlung") +
geom_errorbar(aes(ymin=value-sd.long$value, ymax=value+sd.long$value),
width=0.1,position=position_dodge(.5)) + theme(axis.text.x = element_text(angle = 45,
hjust = 1)) + theme(text = element_text(size = 14))

dev.off()

```

9.5. Herstellerangaben

Lösungen, Substanzen und Kits

CD99-18H	Creative Biomart, Shirley, NY, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Eosin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FACS-Puffer:	
1xPBS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
2 mM EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
2 % FCS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Formaldehyd (4 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HBSS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ketamin	Pfizer Inc, New York City, NY, USA
Malinol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PHA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Proteinase 3	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
QuantiNova Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rapamune®	Pfizer Inc, New York City, NY, USA
RNAlater	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNase freies Wasser	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RNeasy Plus Universal Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Roti©-Sep	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TaqMan Fast Advanced Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Xylocain ® Gel 2 %	AstraZeneca, Wedel, Deutschland
Xylazin	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Vorverdaulösung:

1x HBSS (Ca ²⁺ /Mg ²⁺ +frei)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
10 mM HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
2 mM EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
5 % FCS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
100 U/ml Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Verdaulösung:

1 x RPMI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
10 mM HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
10 % FCS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
100 U/ml Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
+ 10 KU/ml Dnase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
+ 1 mg/ml Kollagenase 1A	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Primer

GAPDH (Mm99999915_g1)

GUSB (Mm00446953_m1)

HGF (Hs04329698_m1)

IFN γ (Hs00989291_m1).

TARC/CCL17 (Mm01244826_g1)

TGF β (Mm01178820_m1)

Bei allen Primern handelt es sich um Single Tube Taqman Gene Expression Assays, die von Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, bezogen wurden.

Geräte und Software

Adobe Photoshop CC 2017

Adobe Systems, San José, CA, USA

Axiovert 40 CFL

Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

Applied Biosystems StepOnePlus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
FACS Canto II	BD bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACS Diva Software	BD bioscience, Heidelberg, Deutschland
FlowJo [®] 10.1	Tree Star, Ashland, OR, USA
Histomat	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mastercycler Gradient	Eppendorf Deutschland, Wesseling-Berzendorf, Deutschland
StepOnePlus™ Software v2.3.	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tissue-Tek®TEC™	Sakura, Staufen, Deutschland
TissueLyser LT	Qiagen, Hilden, Deutschland
ZEN Mikroskopie- und Imaging-Software	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
<u>Sonstige</u>	
Deckgläser 24x60mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Falcons	BD bioscience, Heidelberg, Deutschland
Insulin-BD Mikro-fine Spritze (29G)	BD bioscience, Heidelberg, Deutschland
Leukosep-Röhrchen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Menzel Gläser SuperFrost®Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
S-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>Stainless steel beads</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
Zellsieb (70 µm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

Antikörper

Alle Antikörper für die FACS-Analyse wurden von Biolegend, London, England bezogen.

10 Literaturangaben

ABBAS, A. K., J. LOHR, B. KNOECHEL u. V. NAGABHUSHANAM (2004):

T cell tolerance and autoimmunity.

Autoimmun Rev 3, 471-475

ABRAHAM, C. u. J. H. CHO (2009):

Inflammatory bowel disease.

N Engl J Med 361, 2066-2078

ABREU, M. T. (2010):

Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function.

Nat Rev Immunol 10, 131-144

ANDERSON, C. A., G. BOUCHER, C. W. LEES, A. FRANKE, M. D'AMATO, et al.

(2011):

Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47.

Nat Genet 43, 246-252

AUJLA, S. J., P. J. DUBIN u. J. K. KOLLS (2007):

Th17 cells and mucosal host defense.

Semin Immunol 19, 377-382

BALLOU, L. M. u. R. Z. LIN (2008):

Rapamycin and mTOR kinase inhibitors.

J Chem Biol 1, 27-36

BATTAGLIA, M., A. STABILINI u. E. TRESOLDI (2012):

Expanding human T regulatory cells with the mTOR-inhibitor rapamycin.

Methods Mol Biol 821, 279-293

BAUMGART, D. C. u. S. R. CARDING (2007):

Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology.

Lancet 369, 1627-1640

BAUMGART, D. C. u. A. U. DIGNASS (2002):

Intestinal barrier function.

Curr Opin Clin Nutr Metab Care 5, 685-694

BAUMGART, D. C. u. W. J. SANDBORN (2007):

Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies.

Lancet 369, 1641-1657

BERG, D. F., A. M. BAHADURSINGH, D. L. KAMINSKI u. W. E. LONGO (2002):

Acute surgical emergencies in inflammatory bowel disease.

Am J Surg 184, 45-51

BERNARDO, D., S. VALLEJO-DIEZ, E. R. MANN, H. O. AL-HASSI, B. MARTINEZ-ABAD, et al. (2012):

IL-6 promotes immune responses in human ulcerative colitis and induces a skin-homing phenotype in the dendritic cells and T cells they stimulate.

Eur J Immunol 42, 1337-1353

BERNSTEIN, C. N., M. FRIED, J. H. KRABSHUIS, H. COHEN, R. ELIAKIM, et al. (2010):

World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010.

Inflamm Bowel Dis 16, 112-124

BOIRIVANT, M., I. J. FUSS, A. CHU u. W. STROBER (1998):

Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4.

J Exp Med 188, 1929-1939

BOSMA, M. J. u. A. M. CARROLL (1991):

The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses.

Annu Rev Immunol 9, 323-350

BRUEWER, M., S. SAMARIN u. A. NUSRAT (2006):

Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex.

Ann N Y Acad Sci 1072, 242-252

CALVIELLO, G., H. M. SU, K. H. WEYLANDT, E. FASANO, S. SERINI, et al. (2013):

Experimental evidence of omega-3 polyunsaturated fatty acid modulation of inflammatory cytokines and bioactive lipid mediators: their potential role in inflammatory, neurodegenerative, and neoplastic diseases.

Biomed Res Int 2013, 743171

CARTER, M. J., A. J. LOBO u. S. P. TRAVIS (2004):

Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults.

Gut 53 Suppl 5, V1-16

CHAPMAN-KIDDELL, C. A., P. S. DAVIES, L. GILLEN u. G. L. RADFORD-SMITH (2010):

Role of diet in the development of inflammatory bowel disease.

Inflamm Bowel Dis 16, 137-151

CHASSAING, B., J. D. AITKEN, M. MALLESHAPPA u. M. VIJAY-KUMAR (2014):

Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice.

Curr Protoc Immunol 104, Unit 15.25.

CHAUDHRY, A., R. M. SAMSTEIN, P. TREUTING, Y. LIANG, M. C. PILS, et al. (2011):

Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation.

Immunity 34, 566-578

CHILDERS, R. E., S. ELURI, C. VAZQUEZ, R. M. WEISE, T. M. BAYLESS, et al. (2014):
Family history of inflammatory bowel disease among patients with ulcerative colitis: a
systematic review and meta-analysis.
J Crohns Colitis 8, 1480-1497

COHEN, A. B., D. LEE, M. D. LONG, M. D. KAPPELMAN, C. F. MARTIN, et al. (2013):
Dietary patterns and self-reported associations of diet with symptoms of inflammatory bowel
disease.
Dig Dis Sci 58, 1322-1328

COHEN, I. R. u. D. B. YOUNG (1991):
Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus.
Immunol Today 12, 105-110

CORRIDONI, D., K. O. ARSENEAU u. F. COMINELLI (2014):
Inflammatory bowel disease.
Immunol Lett 161, 231-235

COSNES, J. (2004):
Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical
practice.
Best Pract Res Clin Gastroenterol 18, 481-496

DE FILIPPO, C., D. CAVALIERI, M. DI PAOLA, M. RAMAZZOTTI, J. B. POULLET, et
al. (2010):
Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from
Europe and rural Africa.
Proc Natl Acad Sci U S A 107, 14691-14696

DE JONG, A., T. Y. CHENG, S. HUANG, S. GRAS, R. W. BIRKINSHAW, et al. (2014):
CD1a-autoreactive T cells recognize natural skin oils that function as headless antigens.
Nat Immunol 15, 177-185

DEROCHE, T. C., S. Y. XIAO u. X. LIU (2014):
Histological evaluation in ulcerative colitis.
Gastroenterol Rep (Oxf) 2, 178-192

DI SABATINO, A., P. BIANCHERI, L. ROVEDATTI, T. T. MACDONALD u. G. R.
CORAZZA (2012):
New pathogenic paradigms in inflammatory bowel disease.
Inflamm Bowel Dis 18, 368-371

DIGNASS, A., J. C. PREISS, D. E. AUST, F. AUTSCHBACH, A. BALLAUFF, et al.
(2011):
[Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011].
Z Gastroenterol 49, 1276-1341

DILLER, M. L., R. R. KUDCHADKAR, K. A. DELMAN, D. H. LAWSON u. M. L. FORD
(2016):
Balancing Inflammation: The Link between Th17 and Regulatory T Cells.
Mediators Inflamm 2016, 6309219

- ELLERIN, T., R. H. RUBIN u. M. E. WEINBLATT (2003):
Infections and anti-tumor necrosis factor alpha therapy.
Arthritis Rheum 48, 3013-3022
- ENEIN, A. A., H. A. RAHMAN, N. E. SHARKAWY, S. A. ELHAMID, S. M. ABBAS, et al. (2016):
Significance of CD99 expression in T-lineage acute lymphoblastic leukemia.
Cancer Biomark 17, 117-123
- FAUBION, W. A., JR., E. V. LOFTUS, JR., W. S. HARMSSEN, A. R. ZINSMEISTER u. W. J. SANDBORN (2001):
The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study.
Gastroenterology 121, 255-260
- FLANAGAN, S. P. (1966):
'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse.
Genet Res 8, 295-309
- FOHLINGER, M., P. PALAMIDES, U. MANSMANN, F. BEIGEL, M. SIEBECK, et al. (2016):
Immunological profiling of patients with ulcerative colitis leads to identification of two inflammatory conditions and CD1a as a disease marker.
J Transl Med 14, 310
- FONTENOT, J. D., J. P. RASMUSSEN, M. A. GAVIN u. A. Y. RUDENSKY (2005):
A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells.
Nat Immunol 6, 1142-1151
- FRANCIS, O. L., T. A. MILFORD, S. R. MARTINEZ, I. BAEZ, J. S. COATS, et al. (2016):
A novel xenograft model to study the role of TSLP-induced CRLF2 signals in normal and malignant human B lymphopoiesis.
Haematologica 101, 417-426
- FUSS, I. J., M. NEURATH, M. BOIRIVANT, J. S. KLEIN, C. DE LA MOTTE, et al. (1996):
Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5.
J Immunol 157, 1261-1270
- GARCIA RODRIGUEZ, L. A., A. RUIGOMEZ u. J. PANES (2006):
Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease.
Gastroenterology 130, 1588-1594
- GEEM, D., A. HARUSATO, K. FLANNIGAN u. T. L. DENNING (2015):
Harnessing regulatory T cells for the treatment of inflammatory bowel disease.
Inflamm Bowel Dis 21, 1409-1418

- GEREMIA, A., P. BIANCHERI, P. ALLAN, G. R. CORAZZA u. A. DI SABATINO (2014):
Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease.
Autoimmun Rev 13, 3-10
- GIL, M., H. K. PAK, A. N. LEE, S. J. PARK, Y. LEE, et al. (2015):
CD99 regulates CXCL12-induced chemotaxis of human plasma cells.
Immunol Lett 168, 329-336
- GILL, S. R., M. POP, R. T. DEBOY, P. B. ECKBURG, P. J. TURNBAUGH, et al. (2006):
Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome.
Science 312, 1355-1359
- GRAVANO, D. M. u. K. K. HOYER (2013):
Promotion and prevention of autoimmune disease by CD8+ T cells.
J Autoimmun 45, 68-79
- GREN, S. T. u. O. GRIP (2016):
Role of Monocytes and Intestinal Macrophages in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis.
Inflamm Bowel Dis 22, 1992-1998
- GROSCWITZ, K. R. u. S. P. HOGAN (2009):
Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis.
J Allergy Clin Immunol 124, 3-20; quiz 21-22
- HEISEKE, A. F., A. C. FAUL, H. A. LEHR, I. FORSTER, R. M. SCHMID, et al. (2012):
CCL17 promotes intestinal inflammation in mice and counteracts regulatory T cell-mediated protection from colitis.
Gastroenterology 142, 335-345
- HELLER, F., I. J. FUSS, E. E. NIEUWENHUIS, R. S. BLUMBERG u. W. STROBER (2002):
Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells.
Immunity 17, 629-638
- HESELTON, R. M., D. L. GREINER, J. P. MORDES, T. V. RAJAN, J. L. SULLIVAN, et al. (1995):
High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice.
J Infect Dis 172, 974-982
- HUANG, Y. u. Z. CHEN (2016):
Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity.
Am J Transl Res 8, 2490-2497
- HUETING, W. E., E. BUSKENS, I. VAN DER TWEEL, H. G. GOOSZEN u. C. J. VAN LAARHOVEN (2005):
Results and complications after ileal pouch anal anastomosis: a meta-analysis of 43 observational studies comprising 9,317 patients.
Dig Surg 22, 69-79

- IMAI, T., M. BABA, M. NISHIMURA, M. KAKIZAKI, S. TAKAGI, et al. (1997):
The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4.
J Biol Chem 272, 15036-15042
- IMAI, T., M. NAGIRA, S. TAKAGI, M. KAKIZAKI, M. NISHIMURA, et al. (1999):
Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine.
Int Immunol 11, 81-88
- ISHIDA, T., A. UTSUNOMIYA, S. IIDA, H. INAGAKI, Y. TAKATSUKA, et al. (2003):
Clinical significance of CCR4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma: its close association with skin involvement and unfavorable outcome.
Clin Cancer Res 9, 3625-3634
- ITO, T., Y. J. LIU u. K. ARIMA (2012):
Cellular and molecular mechanisms of TSLP function in human allergic disorders--TSLP programs the "Th2 code" in dendritic cells.
Allergol Int 61, 35-43
- IVANOV, II, K. ATARASHI, N. MANEL, E. L. BRODIE, T. SHIMA, et al. (2009):
Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria.
Cell 139, 485-498
- JESS, T., J. SIMONSEN, N. M. NIELSEN, K. T. JORGENSEN, P. BAGER, et al. (2011):
Enteric Salmonella or Campylobacter infections and the risk of inflammatory bowel disease.
Gut 60, 318-324
- JOSTINS, L., S. RIPKE, R. K. WEERSMA, R. H. DUERR, D. P. MCGOVERN, et al. (2012):
Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease.
Nature 491, 119-124
- JOVANOVIC, K., M. SIEBECK u. R. GROPP (2014):
The route to pathologies in chronic inflammatory diseases characterized by T helper type 2 immune cells.
Clin Exp Immunol 178, 201-211
- KAIKO, G. E., J. C. HORVAT, K. W. BEAGLEY u. P. M. HANSBRO (2008):
Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response?
Immunology 123, 326-338
- KATARU, R. P., K. JUNG, C. JANG, H. YANG, R. A. SCHWENDENER, et al. (2009):
Critical role of CD11b+ macrophages and VEGF in inflammatory lymphangiogenesis, antigen clearance, and inflammation resolution.
Blood 113, 5650-5659

- KAWAI, T. u. S. AKIRA (2007):
Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors.
Trends Mol Med 13, 460-469
- KORETZKY, G. A. (2010):
Multiple roles of CD4 and CD8 in T cell activation
J Immunol 185, 2643-2644
- KUHL, A. A., U. ERBEN, L. I. KREDEL u. B. SIEGMUND (2015):
Diversity of Intestinal Macrophages in Inflammatory Bowel Diseases.
Front Immunol 6, 613
- LANGHOLZ, E., P. MUNKHOLM, M. DAVIDSEN u. V. BINDER (1994):
Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years.
Gastroenterology 107, 3-11
- LARSON, D. W. u. J. H. PEMBERTON (2004):
Current concepts and controversies in surgery for IBD.
Gastroenterology 126, 1611-1619
- LAWRENCE, T. u. G. NATOLI (2011):
Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity.
Nat Rev Immunol 11, 750-761
- LETTERIO, J. J. u. A. B. ROBERTS (1998):
Regulation of immune responses by TGF-beta.
Annu Rev Immunol 16, 137-161
- LEWIS, J. D., S. CHUAI, L. NESSEL, G. R. LICHTENSTEIN, F. N. ABERRA, et al. (2008):
Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in ulcerative colitis.
Inflamm Bowel Dis 14, 1660-1666
- LI, M. O. u. R. A. FLAVELL (2008):
TGF-beta: a master of all T cell trades.
Cell 134, 392-404
- LI, M. O., S. SANJABI u. R. A. FLAVELL (2006):
Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms.
Immunity 25, 455-471
- LI, N., W. WEI, F. YIN, M. CHEN, T. R. MA, et al. (2015):
The abnormal expression of CCR4 and CCR6 on Tregs in rheumatoid arthritis.
Int J Clin Exp Med 8, 15043-15053

- LI, W., H. LI, A. D. BOCKING u. J. R. CHALLIS (2010):
Tumor necrosis factor stimulates matrix metalloproteinase 9 secretion from cultured human chorionic trophoblast cells through TNF receptor 1 signaling to IKBKB-NFKB and MAPK1/3 pathway.
Biol Reprod 83, 481-487
- LICHTENSTEIN, G. R., M. T. ABREU, R. COHEN u. W. TREMAINE (2006):
American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease.
Gastroenterology 130, 940-987
- LOFTUS, E. V., JR. (2004):
Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences.
Gastroenterology 126, 1504-1517
- LOFTUS, E. V., JR. u. W. J. SANDBORN (2002):
Epidemiology of inflammatory bowel disease.
Gastroenterol Clin North Am 31, 1-20
- LONGO, W. E., K. S. VIRGO, A. N. BAHADURSINGH u. F. E. JOHNSON (2003):
Patterns of disease and surgical treatment among United States veterans more than 50 years of age with ulcerative colitis.
Am J Surg 186, 514-518
- LOW, D., D. D. NGUYEN u. E. MIZOGUCHI (2013):
Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research.
Drug Des Devel Ther 7, 1341-1357
- MAHLER, M., D. P. BOGDANOS, P. PAVLIDIS, M. J. FRITZLER, E. CSERNOK, et al. (2013):
PR3-ANCA: a promising biomarker for ulcerative colitis with extensive disease.
Clin Chim Acta 424, 267-273
- MARTINEZ, F. O. u. S. GORDON (2014):
The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment.
F1000Prime Rep 6, 13
- MATRICON, J., N. BARNICH u. D. ARDID (2010):
Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease.
Self Nonsel 1, 299-309
- MITSUYAMA, K., M. NIWA, H. TAKEDATSU, H. YAMASAKI, K. KUWAKI, et al. (2016):
Antibody markers in the diagnosis of inflammatory bowel disease.
World J Gastroenterol 22, 1304-1310
- MIZOGUCHI, A., T. TAKEUCHI, H. HIMURO, T. OKADA u. E. MIZOGUCHI (2016):
Genetically engineered mouse models for studying inflammatory bowel disease.
J Pathol 238, 205-219

MUEGGE, B. D., J. KUCZYNSKI, D. KNIGHTS, J. C. CLEMENTE, A. GONZALEZ, et al. (2011):

Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans.

Science 332, 970-974

MUKHERJEE, S., P. K. MAITI u. D. NANDI (2002):

Role of CD80, CD86, and CTLA4 on mouse CD4(+) T lymphocytes in enhancing cell-cycle progression and survival after activation with PMA and ionomycin.

J Leukoc Biol 72, 921-931

NAKAMURA, T. u. S. MIZUNO (2010):

The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine.

Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 86, 588-610

NEURATH, M. F. (2014):

Cytokines in inflammatory bowel disease.

Nat Rev Immunol 14, 329-342

NGUYEN, G. C., E. A. TORRES, M. REGUEIRO, G. BROMFIELD, A. BITTON, et al. (2006):

Inflammatory bowel disease characteristics among African Americans, Hispanics, and non-Hispanic Whites: characterization of a large North American cohort.

Am J Gastroenterol 101, 1012-1023

NOLTE, T., M. ZADEH-KHORASANI, O. SAFAROV, F. RUEFF, R. VARGA, et al. (2013):

Induction of oxazolone-mediated features of atopic dermatitis in NOD-scid IL2Rgamma(null) mice engrafted with human peripheral blood mononuclear cells.

Dis Model Mech 6, 125-134

NURIEVA, R. I. u. Y. CHUNG (2010):

Understanding the development and function of T follicular helper cells.

Cell Mol Immunol 7, 190-197

OHDA, Y., K. HORI, T. TOMITA, N. HIDA, T. KOSAKA, et al. (2005):

Effects of hepatocyte growth factor on rat inflammatory bowel disease models.

Dig Dis Sci 50, 914-921

OLSEN, T., G. CUI, R. GOLL, A. HUSEBEKK u. J. FLORHOLMEN (2009):

Infliximab therapy decreases the levels of TNF-alpha and IFN-gamma mRNA in colonic mucosa of ulcerative colitis.

Scand J Gastroenterol 44, 727-735

PALAMIDES, P., H. JODELEIT, M. FOHLINGER, F. BEIGEL, N. HERBACH, et al. (2016):

A mouse model for ulcerative colitis based on NOD-scid IL2R gammanull mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells from affected individuals.

Dis Model Mech 9, 985-997

- PETERSON, L. W. u. D. ARTIS (2014):
Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis.
Nat Rev Immunol 14, 141-153
- PEYRIN-BIROULET, L., J. PANES, W. J. SANDBORN, S. VERMEIRE, S. DANESE, et al. (2016):
Defining Disease Severity in Inflammatory Bowel Diseases: Current and Future Directions.
Clin Gastroenterol Hepatol 14, 348-354.e317
- PLEVY, S. (2004):
Do serological markers and cytokines determine the indeterminate?
J Clin Gastroenterol 38, S51-56
- REESE, G. E., V. A. CONSTANTINIDES, C. SIMILLIS, A. W. DARZI, T. R. ORCHARD, et al. (2006):
Diagnostic precision of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease.
Am J Gastroenterol 101, 2410-2422
- RIMOLDI, M., M. CHIEPPA, V. SALUCCI, F. AVOGADRI, A. SONZOGNI, et al. (2005):
Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells.
Nat Immunol 6, 507-514
- RIVINO, L., M. MESSI, D. JARROSSAY, A. LANZAVECCHIA, F. SALLUSTO, et al. (2004):
Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells.
J Exp Med 200, 725-735
- ROAN, F., B. D. BELL, T. A. STOKLASEK, M. KITAJIMA, H. HAN, et al. (2012):
The multiple facets of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) during allergic inflammation and beyond.
J Leukoc Biol 91, 877-886
- ROSENBLUM, M. D., K. A. REMEDIOS u. A. K. ABBAS (2015):
Mechanisms of human autoimmunity.
J Clin Invest 125, 2228-2233
- ROT, A. u. U. H. VON ANDRIAN (2004):
Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells.
Annu Rev Immunol 22, 891-928
- RUSSELL, R. K. u. J. SATSANGI (2004):
IBD: a family affair.
Best Pract Res Clin Gastroenterol 18, 525-539

RUTGEERTS, P., W. J. SANDBORN, B. G. FEAGAN, W. REINISCH, A. OLSON, et al. (2005):

Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis.

N Engl J Med 353, 2462-2476

SAEKI, H. u. K. TAMAKI (2006):

Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases.

J Dermatol Sci 43, 75-84

SAKAGUCHI, S. (2005):

Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self.

Nat Immunol 6, 345-352

SANDBORN, W. J. u. S. B. HANAUER (2003):

Systematic review: the pharmacokinetic profiles of oral mesalazine formulations and mesalazine pro-drugs used in the management of ulcerative colitis.

Aliment Pharmacol Ther 17, 29-42

SANDS, B. E. u. G. G. KAPLAN (2007):

The role of TNFalpha in ulcerative colitis.

J Clin Pharmacol 47, 930-941

SASAKI, M. u. J. M. KLAPPROTH (2012):

The role of bacteria in the pathogenesis of ulcerative colitis.

J Signal Transduct 2012, 704953

SATSANGI, J., M. S. SILVERBERG, S. VERMEIRE u. J. F. COLOMBEL (2006):

The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications.

Gut 55, 749-753

SCHOEPFER, A. M., C. BEGLINGER, A. STRAUMANN, M. TRUMMLER, P.

RENZULLI, et al. (2009):

Ulcerative colitis: correlation of the Rachmilewitz endoscopic activity index with fecal calprotectin, clinical activity, C-reactive protein, and blood leukocytes.

Inflamm Bowel Dis 15, 1851-1858

SEDDIKI, N., L. COOK, D. C. HSU, C. PHETSOUPHANH, K. BROWN, et al. (2014):

Human antigen-specific CD4(+) CD25(+) CD134(+) CD39(+) T cells are enriched for regulatory T cells and comprise a substantial proportion of recall responses.

Eur J Immunol 44, 1644-1661

SHUAI, K. u. B. LIU (2003):

Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system.

Nat Rev Immunol 3, 900-911

SHULTZ, L. D., F. ISHIKAWA u. D. L. GREINER (2007):

Humanized mice in translational biomedical research.

Nat Rev Immunol 7, 118-130

- SHULTZ, L. D., P. A. SCHWEITZER, S. W. CHRISTIANSON, B. GOTT, I. B. SCHWEITZER, et al. (1995):
Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice.
J Immunol 154, 180-191
- SMYTHIES, L. E., A. MAHESHWARI, R. CLEMENTS, D. ECKHOFF, L. NOVAK, et al. (2006):
Mucosal IL-8 and TGF-beta recruit blood monocytes: evidence for cross-talk between the lamina propria stroma and myeloid cells.
J Leukoc Biol 80, 492-499
- SOUMELIS, V., P. A. RECHE, H. KANZLER, W. YUAN, G. EDWARD, et al. (2002):
Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP.
Nat Immunol 3, 673-680
- SPORN, M. B. u. A. B. ROBERTS (1992):
Autocrine secretion--10 years later.
Ann Intern Med 117, 408-414
- STINTON, L. M., C. BENTOW, M. MAHLER, G. L. NORMAN, B. EKSTEEN, et al. (2014):
PR3-ANCA: a promising biomarker in primary sclerosing cholangitis (PSC).
PLoS One 9, e112877
- STROBER, W. u. I. J. FUSS (2011):
Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases.
Gastroenterology 140, 1756-1767
- SUGAMURA, K., H. ASAO, M. KONDO, N. TANAKA, N. ISHII, et al. (1996):
The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID.
Annu Rev Immunol 14, 179-205
- SUGIYAMA, D., H. NISHIKAWA, Y. MAEDA, M. NISHIOKA, A. TANEMURA, et al. (2013):
Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans.
Proc Natl Acad Sci U S A 110, 17945-17950
- SUMMERS, S. A., R. K. PHOON, D. ODOBASIC, L. DEWAGE, A. R. KITCHING, et al. (2011):
Signal transducer and activation of transcription 6 (STAT6) regulates T helper type 1 (Th1) and Th17 nephritogenic immunity in experimental crescentic glomerulonephritis.
Clin Exp Immunol 166, 227-234
- SUZUKI, A., M. T. YAMAGUCHI, T. OHTEKI, T. SASAKI, T. KAISHO, et al. (2001):
T cell-specific loss of Pten leads to defects in central and peripheral tolerance.
Immunity 14, 523-534

TAHARA, Y., A. IDO, S. YAMAMOTO, Y. MIYATA, H. UTO, et al. (2003):
Hepatocyte growth factor facilitates colonic mucosal repair in experimental ulcerative colitis in rats.

J Pharmacol Exp Ther 307, 146-151

TAYLOR, B. C., C. ZAPH, A. E. TROY, Y. DU, K. J. GUILD, et al. (2009):
TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis.

J Exp Med 206, 655-667

TURNER, M. D., B. NEDJAI, T. HURST u. D. J. PENNINGTON (2014):
Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease.
Biochim Biophys Acta 1843, 2563-2582

VALENCIC, E., E. PISCIANZ, A. TOMMASINI u. M. GRANZOTTO (2007):
T cells stimulated in vitro have a suppressive function but do not contain only regulatory T cells.

Clin Exp Immunol 150, 561-566

VIGHI, G., F. MARCUCCI, L. SENSI, G. DI CARA u. F. FRATI (2008):
Allergy and the gastrointestinal system.

Clin Exp Immunol 153 Suppl 1, 3-6

VIGNOT, S., S. FAIVRE, D. AGUIRRE u. E. RAYMOND (2005):
mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives.

Ann Oncol 16, 525-537

WALMSLEY, R. S., R. C. AYRES, R. E. POUNDER u. R. N. ALLAN (1998):
A simple clinical colitis activity index.

Gut 43, 29-32

WEBB, S., C. MORRIS u. J. SPRENT (1990):
Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity.
Cell 63, 1249-1256

WEIGMANN, B., I. TUBBE, D. SEIDEL, A. NICOLAEV, C. BECKER, et al. (2007):
Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue.

Nat Protoc 2, 2307-2311

WILKS, S. (1859):
Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes.
London Medical Times & Gazette 2, 264

WORKMAN, C. J., A. L. SZYMCZAK-WORKMAN, L. W. COLLISON, M. R. PILLAI u. D. A. VIGNALI (2009):

The development and function of regulatory T cells.

Cell Mol Life Sci 66, 2603-2622

- XIAOYAN, Z., R. PIRSKANEN, V. MALMSTROM u. A. K. LEFVERT (2006):
Expression of OX40 (CD134) on CD4+ T-cells from patients with myasthenia gravis.
Clin Exp Immunol 143, 110-116
- YAN, Y., V. KOLACHALA, G. DALMASSO, H. NGUYEN, H. LAROUI, et al. (2009):
Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate
induced colitis.
PLoS One 4, e6073
- ZHANG, X., L. IZIKSON, L. LIU u. H. L. WEINER (2001):
Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration.
J Immunol 167, 4245-4253
- ZHOU, L., M. M. CHONG u. D. R. LITTMAN (2009):
Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation.
Immunity 30, 646-655
- ZHOU, L., J. E. LOPES, M. M. CHONG, IVANOV, II, R. MIN, et al. (2008):
TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat
function.
Nature 453, 236-240
- ZIEGLER-HEITBROCK, L., P. ANCUTA, S. CROWE, M. DALOD, V. GRAU, et al.
(2010):
Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood.
Blood 116, e74-80
- ZWINTSCHER, N. P., P. M. SHAH, S. K. SALGAR, C. R. NEWTON, J. A. MAYKEL, et
al. (2016):
Hepatocyte growth factor, hepatocyte growth factor activator and arginine in a rat fulminant
colitis model.
Ann Med Surg (Lond) 7, 97-103

11 Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Roswitha Gropp, Herrn Prof. Dr. Matthias Siebeck und Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf für ihre Unterstützung und ihr entgegengebrachtes Vertrauen bedanken.

Vielen vielen Dank an meine Kollegen Pia, Michael, Omar und Janina für die schöne Zeit, die harmonische Zusammenarbeit und die große Unterstützung während der praktischen Durchführung der Versuche.

Ein großes Dankeschön geht auch an das ganze Team der Zentralen Versuchstierhaltung – ohne ihre großartige Arbeit wäre das Leben nur halb so einfach.

Danke auch an Saskia für das kritische Durchlesen, auch wenn diese Arbeit ein etwas fachfremdes Gebiet war.

Besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ohne ihren Rückhalt und ihr Vertrauen in mich wäre das alles nicht möglich gewesen: Angefangen bei meinem Studium bis zum heutigen Tag. An gleicher Stelle möchte ich mich auch bei Andy bedanken, dessen unermüdliche Unterstützung, Hilfe und Geduld wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.