

Aus der Klinik für Allgemein, Viszeral-, und Transplantationschirurgie

Klinikum der Universität München

Direktor: Prof.Dr.J.Werner

Mäuse mit humanisiertem Immunsystem  
als Model für Colitis Ulcerosa

Dissertaion

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Orkhan Safarov

aus

Baku

Aserbaidshan

2022

Ich widme diese Doktorarbeit meiner Mutter

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Siebeck  
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Fabian Schnitzler  
  
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin: Dr. Roswitha Gropp  
Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.03.2022

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	6
Abbildungsverzeichnis .....	7
Tabellenverzeichnis.....	7
1. Einleitung.....	8
2. Colitis ulcerosa.....	9
2.1. Definition .....	9
2.2. Epidemiologie .....	10
2.3. Ätiopathogenese.....	11
2.3.1. Immunsystem .....	11
2.3.2. Darmflora .....	12
2.3.3. Genetik .....	13
2.4. Klinische Manifestation .....	14
2.4.1. Symptomatik .....	14
2.4.2. Verlauf.....	16
2.4.3. Komplikationen.....	16
2.5. Diagnostik und Klassifikation.....	16
2.5.1. Diagnostik .....	16
2.5.2. Klassifikation .....	19
2.6. Therapie.....	21
2.7. Prävention des Colonkarzinoms bei Patienten mit Colitis ulcerosa.....	22
2.8. Forschungsfrage .....	24
3. Material und Methoden .....	25
3.1. Humanisierte Mäuse.....	25
3.2. Balb/c-Mäuse .....	26
3.4. Zellkultur.....	27
3.5. Tierversuche.....	28

3.5.1. Studienprotokoll .....	28
3.5.2. Bewertung der klinischen Aktivität.....	28
3.5.3. Bewertung der histologischen Befunde.....	30
3.5.5. Immunohistochemie .....	31
3.6. Durchflusszytometrieanalyse .....	32
3.6.1. Oberflächenphänotypisierung menschlicher Lymphozyten .....	32
3.6.2. Isolierung und Reinigung von LP-T-Zellen .....	33
3.6.3. Intrazelluläre Phänotypisierung menschlicher Lymphozyten .....	33
3.7. Statistische Auswertung .....	34
4. Ergebnisse .....	35
4.1. Makroskopische Untersuchung des Colons .....	37
5. Diskussion .....	51
6. Zusammenfassung.....	59
7. Summary .....	60
Literatur.....	61

## Abkürzungsverzeichnis

AD	Atopische Dermatitis
CAI	Clinical Activity Index
CRP	C-reaktives Protein
FACS	Fluorescence-activated cell scanning
HSC	hämatopoetische Stammzellen
IGA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IGG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IGM	Immunglobulin M
LP	Lamina propria
NK	Natürliche Killer (Zellen)
pANCA	Perinuclear Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells, Mononucleare Zellen des peripheren Blutes
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Koloskopische Aufnahme eines Patienten mit Colitis ulcerosa .....	18
Abbildung 2: IL-4 abhängige Sekretion von IgE in menschlichem Gewebe .....	36
Abbildung 3: Überlebensraten .....	38
Abbildung 4: Makroskopische Untersuchung des Colons .....	39
Abbildung 5: Colon-Schnitte in Paraffin, Auswirkungen des Oxazolons .....	41
Abbildung 6: Box-Plots der histologischen Veränderungen .....	43
Abbildung 7: Immunochemische Proben der mit Oxazolons behandelten Versuchstiere .....	45
Abbildung 8: IgE-Sekretion infolge der Behandlung mit Oxazolons oder Ethanol .....	46
Abbildung 9: Paraffin Sektionen mit Anti-Periostin angefärbt .....	46
Abbildung 10: Verhältnis CD4 zu CD8 Zellen .....	48
Abbildung 11: Verhältnis von Th2:Th1 Zellen .....	48
Abbildung 12: Identifikation von menschlichen T-Zellen, NK-T Zellen und NK Zellen .....	49

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der Colitis ulcerosa nach Silverberg et al. ....	20
Tabelle 2: Leitlinien-Empfehlungen für präventive Darmkrebs-Screenings bei Colitis ulcerosa .....	23

## 1. Einleitung

Bei der Colitis ulcerosa handelt es sich um eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, ähnlich wie bei Morbus Crohn. Bei der Colitis ulcerosa ist vor allem die Schleimhaut des Colons betroffen, die Erkrankung kann sich allerdings auch auf andere Teile des Gastrointestinaltrakts ausbreiten. Auch können nicht alle Schichten der Colon-Schleimhaut betroffen sein, die Entzündung kann sich auch lediglich auf die Submukosa oder auf die Mukosa begrenzen (1).

Bis heute sind die Ursachen der Colitis ulcerosa noch nicht im Detail geklärt. Eine kurative Therapie gibt es derzeit noch nicht. Die Patienten können, je nach Ausprägung unter unterschiedlichen Symptomen leiden. So können lediglich Bauchschmerzen und wässrige Stühle auftreten, oder die Betroffenen können bei schwerer Ausprägung ständig unter blutig-schleimiger Diarrhoe leiden. Auch die Ausscheidung von Eiter ist in schweren Fällen möglich. Blutige und schleimige Durchfälle sind das Leitsymptom einer Colitis ulcerosa. Die Erkrankung kann dabei einmalig auftreten oder die Symptome können immer wieder in Schüben auftreten (5).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem Tiermodell, das es künftig ermöglichen könnte, die Ätiopathogenese der Colitis ulcerosa genauer zu erforschen. Hierfür wurden in der vorliegenden Studie immundefiziente NOD-scid



$\gamma^{\text{null}}$  Mäusen verwendet. Es wurde mittels Oxazolone und Ethanol eine Colitis ulcerosa bei den Versuchstieren induziert. Die Mäuse wurden mit menschlicher PBMC rekonstituiert. Die PBMC-Zellen stammten dabei sowohl von gesunden als auch von Colitis ulcerosa betroffenen Menschen. Bei den Mäusen wurden Colitis ulcerosa ähnliche Symptome induziert, unter anderem Ödembildung und Zerstörung der Darmepithelschicht. Die Versuchstiere wurden anschließend getötet und es wurden Gewebeproben aus dem Colon histopathologisch untersucht.

Die vorliegende Arbeit präsentiert ein geeignetes Tiermodell, um Prozesse im menschlichen Körper zu untersuchen, da solche Experimente aus ethischen Gründen beim Menschen nicht möglich wären.

## 2. Colitis ulcerosa

### 2.1. Definition

Die Colitis ulcerosa gehört mit Morbus Crohn zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Es handelt sich um eine Erkrankung der Schleimhaut des Dickdarms. Die Colitis ulcerosa verläuft vom Rektum aus nach oral. Die Entzündung kann den gesamten Dickdarm betreffen oder nur Teile davon. Hierbei betrifft die Entzündung nicht alle Schichten der Dickdarmschleimhaut, sondern kann sich auch auf die Submukosa oder auf die Mukosa beschränken (1).

Der Verlauf von Colitis ulcerosa ist gekennzeichnet durch Phasen von rezidivierenden Krankheitsschüben, dazwischen können manche Patienten Phasen kompletter Remission und völliger Symptomfreiheit erleben. Bei der Colitis Ulcerosa ist nur der Dickdarm, bzw. die Dickdarmschleimhaut von den Entzündungsschüben betroffen, im Gegensatz zu Morbus Crohn. In der Regel kann sich die Entzündung kontinuierlich und konzentrisch von Rektum bis zu den oral gelegenen Abschnitten des Colons ausdehnen kann (1,2).

Kinder und Jugendliche erleiden hierbei deutlich ausgedehntere Entzündungsreaktionen als Erwachsene. Kinder und Jugendliche leiden häufig an

einer Pankolitis oder einer ausgedehnten Kolitis, bei Erwachsenen manifestiert sich die Erkrankung häufig durch eine distale- oder eine Linksseitenkolitis (2,3,4).

## 2.2. Epidemiologie

Menschen mit Colitis ulcerosa erkranken meist zwischen ihrem 20. und 40. Lebensjahr, allerdings wurde die Erkrankung schon bei Kindern beschrieben (2,3,4). In der westlichen Welt betrifft Colitis ulcerosa 160 bis 250 von 100.000 Personen, hierbei sind Männer und Frauen gleichermaßen betroffen (5, 6).

Die Zahl der Patienten mit Colitis ulcerosa steigt weltweit an, unabhängig davon, ob es sich um ein Entwicklungs- oder Industrieland handelt. Diese Zunahme ist besonders bemerkenswert in Nationen mit gleichzeitig verbesserten Möglichkeiten zur Datenerfassung. In Europa gilt dies vor allem für Skandinavien, Griechenland und Teile von Großbritannien (6).

Die Inzidenz liegt 9-20 pro 100.000 Personen pro Jahr in Industrieländern einschließlich Nordamerika, Nordeuropa, Vereinigten Staaten Königreich und Irland (7-10). In Deutschland liegt die Inzidenz von Colitis ulcerosa bei 6/100.000 pro Jahr (7-10). Von den Personen, die hierzulande an Colitis ulcerosa erkranken sind 1.500 Kinder und Jugendliche. Hierbei soll das Stillen protektiv wirken und das Risiko an Colitis ulcerosa zu erkranken, deutlich senken (11). Andererseits soll eine wiederholte Einnahme von Antibiotika bei Kindern das Risiko, eine chronisch entzündliche Darmerkrankung zu entwickeln, erhöhen. Auch die Genetik spielt eine Rolle, es wurde eine familiäre Häufung der Krankheit beobachtet (5, 11). Das Erkrankungsrisiko für Geschwister von Patienten mit Colitis ulcerosa ist 15x höher als in der übrigen Bevölkerung (5,11,12). Die Erkrankung beginnt meistens im jüngeren Erwachsenen Alter (20.-40. Lebensjahr).

Die Zahl der Menschen in Deutschland, die an Colitis ulcerosa leiden, wird auf rund 168.000 geschätzt. Dies gilt einschließlich der Patienten mit einer Proktitis. So leben in Deutschland rund 20 pro 10.000 Bundesbürger mit Colitis ulcerosa. Hierbei sind Männer und Frauen gleichermaßen betroffen, es gibt also keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern. Häufig betrifft die Erkrankung junge

Erwachsene zwischen 25 und 35 Jahren. Die Erkrankung kann jedoch in jedem Alter auftreten (66).

## 2.3. Ätiopathogenese

### 2.3.1. Immunsystem

Grund für die Entzündungen bei Colitis ulcerosa ist eine Aktivierung sowohl des erworbenen als auch des angeborenen Immunsystems im Bereich des Darms. Colitis ulcerosa stellt demnach eine Autoimmun-Erkrankung dar. Weshalb das körpereigene Immunsystem aktiviert wird, ist bis heute nicht bekannt. Allerdings geht man aktuell von einem Mangel an T-regulatorischen Zellen bzw. Suppressorzellen aus. Andererseits könnte es auch an einer erhöhten Anzahl an T-Zellen insgesamt sein und infolgedessen eine Überaktivierung des Immunsystems sein. Ebenso ist es möglich, dass eine Mischung aus beiden Faktoren besteht (5, 13).

Trotz immenser Bemühungen in den letzten 20 Jahren bleibt die genaue Ätiologie von Colitis ulcerosa bislang ungeklärt. Es wird vermutet, dass es bei einem genetischen prädisponierten Wirt durch eine Reihe von Umweltfaktoren zur Krankheitsmanifestation kommt. Die Überaktivierung des Immunsystems im Darm könnte somit multifaktoriell bedingt sein (5). Die gesamte Oberfläche des menschlichen Darms erstreckt sich über 200 bis 400 Quadratmeter (14).

Die innere Zellauskleidung des Darms dient nicht nur als Barriere zum Schutz des Wirts vor schädlichen Krankheitserregern, sondern auch als Ort, an dem Wechselwirkungen mit kommensalen Mikroorganismen auftreten. Diese Wechselwirkungen werden vom intestinalen Immunsystem balanciert und tragen zur Immunhomöostase bei. Aus verschiedenen und noch ungeklärten Gründen können idiopathische Darmentzündungen wie Colitis Ulcerosa auftreten, wenn diese Homöostase gestört ist (5, 15,16).

Eine weitere mögliche Ursache könnten vergangene Infektionen sein, kombiniert mit einer defekten Schutzfunktion des Mukosaepithels. Die Infektionen aktivieren sowohl das angeborene- als auch das erworbene Immunsystem. Es kann zu

massiven Entzündungsreaktionen kommen sowie zu einer gestörten Balance zwischen aktivierten T-Zellen und Supressorzellen. Darüber hinaus kommt es zu einer pathologisch erhöhten Reaktion der T-Zellen, bei Colitis ulcerosa vor allem der Th2-Zellen. Die Entzündung kann sich dadurch chronifizieren (13).

Zytokine spielen wichtige Rolle bei der Immunopathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Es wurde gezeigt, dass im Darmgewebe eine große Anzahl immunkompetenter T-Zellen sowie Antigen-präsentierender Zellen (dendritische Zellen (DC) und Makrophagen) vorliegen. Diese finden sich meistens in den Peyer-Plaques und in der Lamina propria (29). Durch mukosale Antigene und Bakterien werden eine große Anzahl von T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, DC und Neutrophilen in die Lamina propria sezerniert (30,31). Nach Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen differenzieren CD4+ bei Vorhandensein IL-4 zu Th-2 Zellen. Th-2 Zellen sezernieren unter anderem IL-4 und IL-5 (32).

### 2.3.2. Darmflora

Die epitheliale Oberfläche des Darmes dient dazu, die Schleimhaut zu schützen. Die Schleimschicht besteht aus glykosyliertem Mucin aus Becherzellen sowie Defensinen aus Paneth-Zellen und intestinalen Epithelzellen. Ein Hauptbestandteil von Mucin wird von Muc2 kodiert, und bei Deletion von Muc2 bei Mäusen entwickelt sich eine spontane Kolitis (17). Bei UC-Patienten werden Mangel von Becherzellen und Reduktion der Schleimschicht festgestellt (18).

Normalerweise können nur geringe Mengen von Bakterien und Mikroorganismen das Darmepithel durchdringen (19). Wenn die Permeabilität des Darmepithels erhöht wird, wird durch hohen Zufluss von Bakterien eine Darmentzündung ausgelöst, was eine mögliche Erklärung für die Pathogenese von entzündlichen Darmerkrankungen sein könnte (20).

Beim gesunden Menschen spielen die Kommensalen eine wesentliche Rolle beim Schutz der Darmhomöostase. Sie beeinflussen die entscheidende Nährstoffversorgung, die Entwicklung des Immunsystems und die Modulation des Energiestoffwechsels (21, 22). Die Mehrzahl der Kommensalen besteht aus gramnegativen Bakterien wie Bacteroidetes und grampositiven Bakterien wie

Firmicutes. Andere kleinere Abteilungen umfassen Proteobakterien, Actinobakterien, Fusobakterien und Verrucomicrobia (23).

Bei dem Patienten mit chronischen entzündlichen Darmerkrankungen ist die Zahl dieser Bakterien deutlich reduziert (24). Es gibt Hinweise darauf, dass Kommensale eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielen (25-28).

### 2.3.3. Genetik

Ein weiterer Faktor bei der Ätiopathogenese der Colitis ulcerosa ist die Genetik. Es besteht eine 10-20 % Familienanamnese bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Es konnte gezeigt werden, dass sich chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie die Colitis ulcerosa in Familien häufen können, was eine genetische Komponente nahelegt. Es gibt Hinweise darauf, dass das Risiko, eine chronisch entzündliche Darmerkrankung zu entwickeln, bei Menschen, deren Familienmitglieder und Verwandte bereits an einer solchen leiden, deutlich erhöht ist. Insbesondere ist dies der Fall bei Verwandtschaften ersten Grades, also Eltern und Geschwister (33,34). Eine Studie hat ergeben, dass das Risiko für eine chronisch entzündliche Darmerkrankung bei eineiigen Zwillingen signifikant erhöht ist, wenn der eine Zwilling an einer solchen leidet. Im Gegensatz dazu war das bei zweieiigen Zwillingen nicht der Fall. Bei ihnen war das Risiko nur geringfügig (4 %) erhöht, wenn der eine Zwilling erkrankt war (35).

Im Rahmen einer Studie wurden molekulargenetische Analysen durchgeführt. Mittels Linkage-Analysen hat sich ergeben, dass mehr als 163 genetische Loci für das Erkrankungsrisiko an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung verantwortlich sein können. Bei Colitis ulcerosa fokussiert sich die molekulargenetische Forschung vorwiegend auf die Barrierefunktion des intestinalen Epitheliums (35,36). So hat eine Studie ergeben, dass eine Mutation auf dem MDR1-Gen für ein deutlich erhöhtes Erkrankungsrisiko an Colitis ulcerosa verantwortlich sein könnte (37).

## 2.4. Klinische Manifestation

### 2.4.1. Symptomatik

Bei einer Colitis ulcerosa wird die Darmschleimhaut stark beschädigt. Infolgedessen leiden die Patienten an blutigen und schleimigen Durchfällen, die auch eitrig sein können. Diese blutig-schleimigen Durchfälle stellen das Leitsymptom einer Colitis ulcerosa dar (5). Hinzukommen können Abdominalschmerzen, Tenesmen, Gewichtsverlust und Fieber(selten) kann als Begleitsymptom bezeichnen (5).

Als extraintestinale Symptome werden folgende Erkrankungen beschrieben (5,9):

- Haut: Erythema nodosum, Pyoderma gangrenosum
- Gelenke: Polyarthritis, Monoarthritis, Sakroileitis
- Augen: Iridozyklitis, Uveitis
- Lungen: fibrosierende Alveolitis
- Nieren: Amyloidose
- Herz: Peri-myokarditis
- Blut: autoimmunhämolytische Anämie, Thromboseneigung
- Leber, Gallenwege: primär sklerosierende Cholangitis.

Die Erkrankung beginnt bei den meisten Patienten schleichend. Die Betroffenen leiden unter Diarrhoe, für die es vorerst keine Erklärung gibt. Begleitet wird die Diarrhoe von leichten Schmerzen im Abdomen. Es kommt tagsüber zu einer häufigen Stuhlentleerung, trotzdem können die Patienten das Gefühl haben, dass sich im Darm immer noch Inhalt befindet und der Darm somit nicht vollständig entleert wurde (5).

Mit der Zeit werden die Durchfälle immer häufiger und auch intensiver. Allerdings beginnt die Erkrankung nicht bei allen Patienten schleichend, die Symptome können auch akut oder fulminant einsetzen. In solchen Fällen erleiden die Patienten starke Schmerzen im Abdomen, heftige und blutige Durchfälle, verlieren an Gewicht und auch Fieber kann in solchen Fällen hinzukommen (5,9).

Eine Colitis ulcerosa manifestiert sich durch häufigen Stuhldrang, Diarrhoe und Abdominalkrämpfe. Betroffene erleiden nicht nur tagsüber Diarrhoe und häufigen Stuhldrang, auch nachts müssen sie häufig aufstehen und den Darm entleeren (5,9).

Hinzu kommen infolgedessen Tagesmüdigkeit und auch ein Krankheitsgefühl sowie Abgeschlagenheit. Die Manifestation solcher Symptome hängt allerdings auch davon ab, wie stark die Entzündungsreaktion im Darm ist. Eine Colitis ulcerosa kann sich unterschiedlich manifestieren – es gibt hierbei nur leichte- bis hin zu sehr schweren Fällen (5,9). Die Schwere der Erkrankung wird mit dem Clinical Activity Index (CAI) klassifiziert und beurteilt. Dies hängt davon ab, wie stark die Durchfälle beim Patienten sind und somit wie häufig die Stuhlgänge auftreten. Darüber hinaus spielen auch das allgemeine Befinden der Patienten sowie die Begleitsymptome wie Fieber eine Rolle. Bei rund 60 % der Colitis ulcerosa Patienten verläuft die Erkrankung nur in einer leichten Form. Hierbei ist die Entzündungsreaktion lediglich auf das Rektum beschränkt. Die Entzündung klingt nach einer bestimmten Zeit von alleine ab. Die betroffenen Patienten leiden unter Durchfällen, die auch blutig und schleimig sein können, allerdings kommen hierbei keine weiteren Symptome hinzu. Die Patienten müssen circa fünf Mal täglich auf die Toilette zum Stuhlgang (5,9).

Einen mittelschweren Erkrankungsverlauf erleben circa 25 % der Betroffenen. Diese müssen etwa sechs bis acht Mal täglich zur Toilette und es kommt ebenso wie bei den Patienten mit leichtem Verlauf zu schleimigen und/oder blutigen Durchfällen. Allerdings leiden die Patienten mit einem mittelschweren Krankheitsverlauf auch unter Fieber über 38°C. Darüber hinaus kommt es bei ihnen zu Abdominalkrämpfen und -Schmerzen, so dass bei ihnen ein deutliches Krankheitsgefühl auftritt (5,9).

Unter einer schweren Manifestation der Colitis ulcerosa leiden 10-15 % der Patienten. Sie leiden unter hohem Fieber, Tachykardie sowie den typischen blutig-schleimigen Durchfällen, zu denen es mehr als acht Mal täglich kommt. Ferner kommt es bei den Betroffenen zu hohem Fieber (39°C+) und einem ausgeprägten Krankheitsgefühl sowie Schwäche (5,9).

#### 2.4.2. Verlauf

Die Verlaufsformen der Colitis ulcerosa sind unterschiedlich. Bei 50-80 % der Patienten kommt es zu einem chronisch-rezidivierenden Krankheitsverlauf. 15-30 % der Betroffenen sind von einer chronisch-aktiven Verlaufsform betroffen und bei 5 % der Patienten verläuft die Krankheit fulminant (5,9, 12). Bei der chronisch-rezidivierenden Form ist nur der distale Teil des Darms (distales Colon, Sigma und Rektum) betroffen und die Patienten bleiben nach einer einzigen Krankheitsattacke langjährig beschwerdefrei (12). Die chronisch-aktive Verlaufsform ist von einer Persistenz der Symptome unterschiedlicher Intensität ohne Phasen der Symptombefreiheit charakterisiert (5,12).

#### 2.4.3. Komplikationen

Der fulminante Verlauf ist durch schwerwiegende akute Krankheitssymptome mit Durchfällen, Tenesmen, hohem Fieber, Dehydratation, Schock, Peritonitis und toxischem MegaColon gekennzeichnet. 30 % der Patienten versterben bei einer fulminanten Manifestation der Colitis ulcerosa (5,12). Bei einem schweren oder fulminanten Verlauf der Colitis ulcerosa kann es zu starkem Blutverlust durch massive Blutungen der Darmschleimhaut kommen. Darüber hinaus kommt es zu einer gestörten Darmmotilität infolge der exulzerierten Mucosa. Es entwickelt sich ein toxisches Megacolon. Es besteht die Gefahr einer Perforation (5,9, 12,38).

### 2.5. Diagnostik und Klassifikation

#### 2.5.1. Diagnostik

Die aktualisierte S3-Leitlinie Colitis ulcerosa gibt folgende Empfehlung zur Diagnostik einer Colitis ulcerosa

*„Die Diagnose einer Colitis ulcerosa soll auf dem Boden einer Kombination von Anamnese, klinischer Untersuchung und typischen laborchemischen,*



*sonografischen, endoskopischen und histologischen Befunden gestellt werden“ (5, S. 1328)*

Eine rasche und vor allem frühzeitige Diagnose der Colitis ulcerosa sowie des Schweregrades sind für eine rechtzeitige und gezielte Therapie von entscheidender Relevanz (5). Allerdings existiert bis heute noch kein Goldstandard zur Diagnostik der Colitis ulcerosa (5). Die Diagnostik basiert auf einer Kombination von Anamnese, typischen Befunden aus der Blutuntersuchung, Endoskopie und Histopathologie. Die Verdachtsdiagnose erfolgt mittels der typischen Symptome, über die der Patient berichtet. Darüber hinaus gibt der Patient eine Stuhlprobe ab, um mögliche infektiöse Ursachen der Symptome auszuschließen (5).

Bei der Blutuntersuchung können Anämie, eine erhöhte Anzahl an Leukozyten, eine erhöhte Konzentration an Immunglobulin M (IGM), Immunglobulin A (IGA), sowie Immunglobulin G (IGG) festgestellt werden. Ferner zeigt das Blutbild eine deutliche erhöhte Konzentration an C-reaktivem Protein (CRP). Darüber hinaus findet sich bei Patienten mit Colitis ulcerosa häufig ein positiver Befund auf Perinuclear Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody (pANCA) im Rahmen der Serologie (5).

Um die Verdachtsdiagnose zu bestätigen, wird eine Koloskopie durchgeführt. Diese erlaubt eine direkte Visualisierung der Innenwände des Darms (5) wie in der nachfolgenden Abbildung 1 zu sehen ist.

So kann das Ausmaß der Erkrankung auch näher untersucht werden. So sind im Rahmen einer Koloskopie Rötung der Schleimhaut, Schleimhautblutungen, unregelmäßige Geschwüre, Pseudopolypen und der Verlust der vaskulären Architektur zu beobachten. Um die Schwere der Kolitis zu bestimmen, können während der koloskopischen Untersuchung kleine Gewebeproben entnommen werden. Im Rahmen der Biopsien werden Kryptenunregelmäßigkeiten, Krypta-Abszess und die Zerstörung der epithelialen Grenze diagnostiziert (5). Ein Bariumeinlauftröntgen kann alternativ bei der Diagnose hilfreich sein. Eine sonografische Untersuchung kann die Verdickung der betroffenen Darmwandbereiche aufzeigen. Das gleiche gilt für CT und MRT (5).

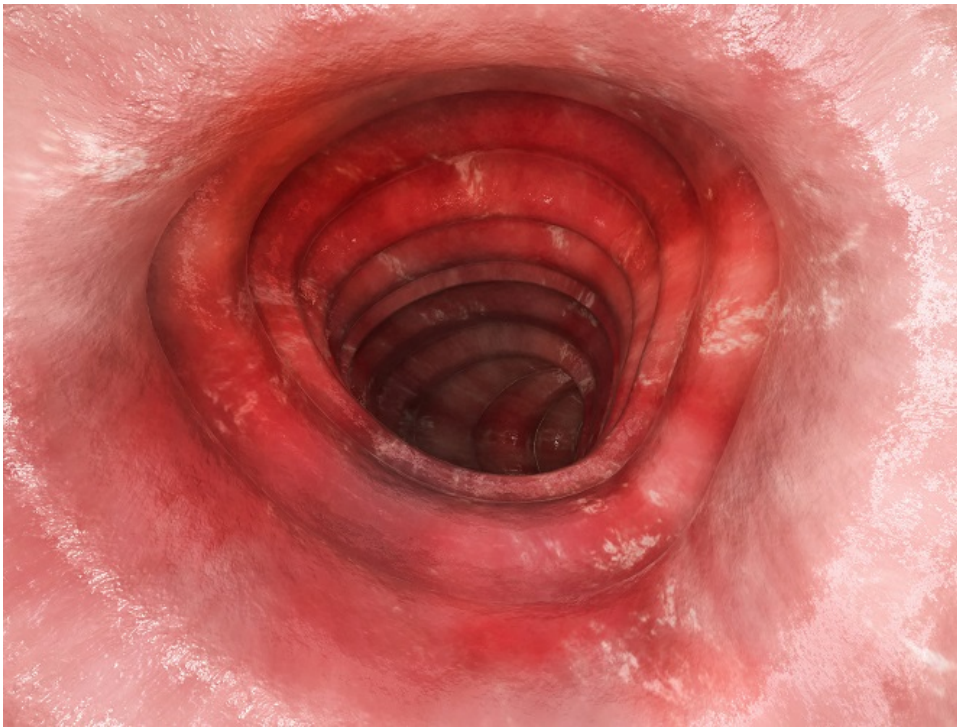


Abbildung 1: Koloskopische Aufnahme eines Patienten mit Colitis ulcerosa. Quelle: Biermann Medizin, © Fotolia, <https://biermann-medizin.de/dgvs-aktualisiert-leitlinie-zur-diagnostik-und-behandlung-von-colitis-ulcerosa/> (Abruf am 20.05.2021)

In Abb. 1 ist die Entzündung des Darms deutlich erkennbar.

Zu Beginn der Diagnostik sollte eine ausführliche Anamnese erhoben werden.

*„Die Anamnese sollte eine detaillierte Erfragung über Art und Beginn der Symptome, eine kürzliche Reiseanamnese, Nahrungsmittelunverträglichkeiten, Kontakte mit infektiösen Durchfallerkrankungen, Impfstatus, Raucheranamnese, Familienanamnese und die Medikamentenanamnese (insbesondere auch bezüglich Antibiotika und nichtsteroidaler Antirheumatika) umfassen. Weiterhin sollte die Anamnese Fragen bezüglich extraintestinaler Manifestationen (Mund, Haut, Augen und/oder Gelenke) sowie nach perianalen Abszessen, Fisteln und Analfissuren umfassen. Expertenkonsens, Empfehlung, Konsens“ (5, S.1327)*

Eine Anamnese und eine körperliche Untersuchung erfolgen als Erstes in der Diagnostik der Colitis ulcerosa. Bei einer Verdachtsdiagnose einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung ist es von maßgeblicher Relevanz vor allem zwischen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn zu unterscheiden (5).

Allerdings gestaltet sich hierbei die Differentialdiagnostik schwierig. In manchen Fällen ist sogar nicht festzustellen, ob der betroffene Patient unter Colitis ulcerosa

oder einem Morbus Crohn leidet (5). Es hängt auch davon ab, ob der jeweilige Patient aktiv raucht oder nicht. So ist bei rauchenden Patienten eher einen Morbus Crohn zu denken, wenn kein Blut im Stuhl vorhanden ist. Außerdem ist die Differentialdiagnose zwischen einer intrinsischen- und einer durch Medikamente induzierten Colitis vorzunehmen. Bevor eine Colitis ulcerosa diagnostiziert werden kann, sollte anamnetisch erfasst werden, ob die vorliegende Colitis durch Medikamente oder Infektionen ausgelöst worden ist. So können Nebenwirkungen bestimmter Medikamente mit einer Colitis einhergehen (5).

Es liegt Evidenz vor, dass aktives Rauchen einen Einfluss auf die Entwicklung einer Colitis ulcerosa hat. Studien haben gezeigt, dass Rauchen einen protektiven Effekt zu haben scheint (40,41). Das Risiko von Patienten, die mit dem Rauchen aufgehört haben, liegt um 70 % höher eine Colitis ulcerosa zu entwickeln im Vergleich zu den aktiven Rauchern (40,41). Darüber hinaus zeigt sich bei den Ex-Rauchern häufig eine refraktäre und ausgedehnte Manifestation der Colitis ulcerosa. So sind schwere Manifestationen der Erkrankung vor allem bei Ex-Rauchern zu finden im Vergleich zu Nie-Raucher und Raucher. Fangen die Ex-Raucher allerdings wieder mit dem Rauchen an, so verläuft bei ihnen die Colitis ulcerosa deutlich milder als bei diejenigen, die Nichtraucher geblieben sind (5, 40, 42). Somit ist die Ermittlung des Raucherstatus ein entscheidender Aspekt in der Anamnese, wenn es um die Diagnostik der Colitis ulcerosa geht (5, 40-42).

### 2.5.2. Klassifikation

Die aktuellen Leitlinien (5) empfehlen eine Klassifikation der diagnostizierten Colitis ulcerosa.

*„Eine Klassifikation bezüglich der Ausdehnung der Erkrankung soll erfolgen. Es soll eine endoskopische Einteilung in die Proktitis (begrenzt auf das Rektum), die Linksseitencolitis (Ausdehnung bis zur linken Flexur) und die ausgedehnte Colitis erfolgen. Expertenkonsens, starke Empfehlung, starker Konsens“ (5, S. 1326)*

Kucharzik et al. (2019) benennen zwei wesentliche Gründe, weshalb eine Klassifikation der Colitis ulcerosa sinnvoll ist:

1. Ein wesentlicher Grund ist, dass die Lokalisation der Colitis ulcerosa maßgeblich für die Entscheidung für eine bestimmte Therapiemaßnahme ist. So entscheidet die jeweilige Klassifikation und die Lokalisation der Krankheit über den Einsatz von entweder systemischer- oder topischer medikamentöser Therapie. Liegt eine Proktitis vor, so werden bevorzugt Suppositorien eingesetzt, während bei einer linksseitigen Colitis Einläufe oder Schaumpräparate gegeben werden. Hat sich die Erkrankung ausgezehnt, so werden dem Patienten die Medikamente oral verabreicht, kombiniert mit einer topischen Therapie (5).

2. Inwieweit sich die Erkrankung ausgezehnt hat, beeinflusst auch die Art und Weise des Überwachungsmanagements auf etwaige Karzinome. Je nach Ausdehnung und Klassifikation der Colitis ulcerosa erfolgt das Management der Vorsorgeuntersuchungen auf Colonkarzinome (5).

So wird die Colitis ulcerosa bevorzugt eingeteilt in (5):

- Proktitis
- Linksseitige Colitis
- Ausgedehnte Colitis mit Ausdehnung über die linke Flexur

Die Klassifikation nach Silverberg et al. (3,39)

Klassifikation	Manifestation	Beschreibung
E1	Proktitis	Die Ausdehnung der Erkrankung ist lediglich auf das Rektum, distal auf den rektosigmoidalen Übergang beschränkt
E2	Linksseitencolitis	Die Erkrankung hat sich bis zur linken Flexur ausgezehnt.
E3	Ausgedehnte Colitis	Die Erkrankung hat sich über die linke Flexur hinaus ausgezehnt, eine Pancolitis kann vorliegen.

Tabelle 1: Klassifikation der Colitis ulcerosa nach Silverberg et al.

Quelle: eigene Darstellung nach (5)

## 2.6. Therapie

Bis heute existiert keine kausale Therapie der Colitis ulcerosa. Allerdings können mithilfe von Medikamenten die Symptome deutlich gelindert werden. So können die Entzündungsprozesse mittels antiinflammatorischer Medikamente unterdrückt werden. Symptome wie Diarrhoe, rektale Blutungen und Bauchschmerzen können ebenfalls mit der Gabe von Medikamenten gelindert werden. Mit der Ernährung und supportiver Therapie kann eine Milderung der Klinik der Krankheit erreicht werden (5).

Es gibt bislang noch keine Empfehlung für eine spezielle Ernährung bei Colitis ulcerosa (5). Die Patienten sollten aber schwer verdauliche Speisen vermieden und auf eine leicht verdauliche und ausgewogene Ernährung achten. Wichtig ist es, einem Nährstoffmangel vorzubeugen. Mangelzustände bei Malabsorption (Blut, Eiweiß, Flüssigkeit, Elektrolyte, Mineralien, Vitamine) sollten möglichst ausgeglichen werden. Bei schweren Schüben kann unter Umständen eine ballaststofffreie Flüssignahrung gegeben oder parenterale Ernährung durchgeführt werden (5).

Bei circa 50 % der Patienten manifestiert sich die Colitis ulcerosa so, dass eine immunsuppressive Behandlung mit TNF-Antikörpern Steroiden oder Thiopurinen indiziert ist (43, 44). Wichtig ist hierbei zu beachten, dass das Risiko für Infektionen unter einer immunsuppressiven Therapie deutlich erhöht ist (45).

Bei einer Colitis ulcerosa sind grundsätzlich fünf Hauptklassen von Medikamenten indiziert, je nach Schweregrad, Klassifikation und Manifestation der Erkrankung (5):

1. Aminosalizylate (5-ASA).

Es handelt sich um antiinflammatorische Medikamente. Dazu gehören Sulfasalazin, Mezalamine, Balsalazide und Olsalazine. Bei den milden Verlaufsformen werden meistens dieser Medikamente bevorzugt.

## 2. Corticosteroide

Bei der Behandlung von mittelschweren bis schweren aktiven UC wird Kortikosteroide benutzt, die das Immunsystem unspezifischen. Deren starke immunsuppressive Wirkung sind Hemmung der Arachidonsäure-Kaskade, IFN- $\gamma$  und IL-1, 2, 4, 5, 6, 8.

## 3. Immune Modulatoren

Azathioprin (Imuran), 6-mercaptopurine und Methotrexat. Entzündungshemmende Effekte entfalten sie aufgrund der Unterdrückung der NK-Zell-Aktivität und T-Zell-Funktion.

## 4. Antibiotika: Metranidazol, Ampicillin, Ciprofloxacin und andere.

## 5. Antidiarrhoika (Z.B Loperamid)

Bei der symptomatischen Behandlung wird Antidiarrhoikän benutzt, um kurzfristige Verbesserung zu erreichen (5).

## Chirurgische Therapie:

Bei Patienten, bei denen schwere Blutungen, toxisches MegaColon und schwere Erkrankungen vorliegen, die durch konservative Maßnahmen nicht deutlich verbessert werden können, ist ein chirurgischer Eingriff indiziert. Da bei diesen Patienten das Rektum immer betroffen ist, muss eine totale Proktokolektomie mit ileoanaler Anastomose und kontinentem Pouch (Ersatzampule) angesterbt werden (5).

## 2.7. Prävention des Colonkarzinoms bei Patienten mit Colitis ulcerosa

Das Risiko eines colorektalen Karzinoms ist bei Patienten mit Colitis ulcerosa deutlich erhöht. Insofern empfehlen die aktuellen Leilinen (5): *„Die Überwachungskoloskopie bei PSC sollte als Chromoendoskopie oder als hochauflösende Weißlichtendoskopie (HDWLE) mit gezielten Biopsien*

durchgeführt werden. Zusätzlich sollten bei der PSC zufällige Stufenbiopsien entnommen werden. Evidenzgrad 2, Empfehlungsgrad B, Konsens“ (5, S. 1336) Je nach Schweregrad, Manifestation und Klassifikation sollten demnach die präventiven Untersuchungen erfolgen (5). Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht darüber, in welchem Zeitintervall, je nach Manifestation und Klassifikation der Colitis ulcerosa und auch abhängig von weiteren Faktoren erfolgen soll. Die untenstehende Tabelle gilt für Patienten, die seit mehr als 8 Jahren an Colitis ulcerosa erkrankt sind (5).

<b>Jährliche Untersuchungen</b>	<b>Alle zwei Jahre</b>	<b>Alle zwei bis vier Jahre</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwere Colitis ulcerosa mit ausgedehnten Inflammationen (E3)</li> <li>• Familiäre Häufung des colorektalen Karzinoms</li> <li>• IEN während den vergangenen fünf Jahren</li> <li>• Stenose</li> <li>• PSC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Milde bis mittelgradige Colitis (E2)</li> <li>• Vorhandensein von zahlreichen Pseudopolypen</li> <li>• Verwandter erste Grad mit colorektalem Karzinom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kein Kriterium für ein Darmkrebs-Risiko liegt vor</li> </ul>

Tabelle 2: Leitlinien-Empfehlungen für präventive Darmkrebs-Screenings bei Colitis ulcerosa

Quelle: eigene Darstellung, modifiziert nach (5).

Hierbei geben die Leitlinien folgende Empfehlung ab:

*„Bei Patienten mit Befall über das Rektum hinaus sollen regelmäßige Überwachungskoloskopien ab dem 8. Erkrankungsjahr durchgeführt werden. Expertenkonsens, starke Empfehlung, Konsens.*

*Die Überwachungsstrategie sollte individuell abgestimmt werden, und dabei sollte sich das Intervall nach einer Risikostratifizierung richten. Nach dieser Risikostratifizierung sollte bei Patienten mit einem hohen Risiko (Stenose, IEN innerhalb der letzten 5 Jahre, ausgedehnte Colitis mit ausgeprägter Entzündung oder erstgradigem Verwandten mit KRK < 50 J.) jährlich und bei Patienten mit einem intermediären Risiko (Colitis mit milder oder mäßiger Entzündung, viele Pseudopolypen, erstgradiger Verwandter mit KRK ≥ 50 J.) alle 2–3 Jahre und bei Patienten mit einem niedrigen Risiko (es liegen keine der genannten Faktoren vor) alle 4 Jahre eine Überwachungskoloskopie durchgeführt werden. Expertenkonsens, Empfehlung, Konsens“ (5, S. 1335)*

## 2.8. Forschungsfrage

In der vorliegenden Arbeit wurde die Induktion von Oxazolone vermittelte Colitis in normalgewichtigen Mäusen mit schwerer Diabetes mellitus und Immunschwäche interleukin-2R $\gamma$  null (NOD-SCID IL2R $\gamma$ <sup>null</sup>) untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde Oxazolone und Ethanol vermittelte Colitis in immungeschwächten NOD-scid IL2R  $\gamma$ <sup>null</sup> Mäusen, die mit humaner PBMCs rekonstituiert wurde, induziert. hPBMC-Zellen stammen aus gesunde und von Colitis ulcerosa-Patienten. Es wurde an diesen Mäusen ähnliche Symptome (Ödembildung, Zerstörung der Darmepithelschicht, die Fibrose und Zufluss von Entzündungszellen in Lamina propria) festgestellt wie bei Patienten mit Colitis ulcerosa.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Mäuse mit humanisiertem Immunsystem

In vivo-Systeme sind essentiell, wenn es um die Erforschung von Erkrankungen des Immunsystems geht. Bei den Reaktionen des Immunsystems handelt es sich um sowohl zeitlich- als auch räumlich limitierte Prozesse. Diese beinhalten komplexe Interaktionen zwischen immobilen Epithelzellen und migratorischen Immunzellen (46). Allerdings sind die Möglichkeiten, diese inflammatorischen Prozesse beim Menschen zu untersuchen, aus ethischen Gründen stark limitiert. Deshalb werden häufig Mäuse als Versuchstiere hierfür eingesetzt. Es stellt sich allerdings die Frage, inwiefern die Ergebnisse an Mäusen auf den Menschen übertragbar sind (46).

Deshalb stellen Mäuse mit humanisiertem Immunsystem ein entscheidendes Werkzeug zur Erforschung von in-vivo-Prozessen dar, wenn es um menschliche Zellen und menschliches Gewebe geht. Mäuse mit humanisiertem Immunsystem erhalten eine Transplantation von menschlichem Gewebe, hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) oder mononuklearen Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Dadurch werden sie quasi „humanisiert“. Dies bietet die Möglichkeit menschliche biologische Prozesse *in vivo* zu untersuchen. Es können Versuche durchgeführt werden, die beim Menschen ethisch nicht möglich wären (46).

Zuerst wurden im Jahr 1983 die PRKDC Scid-Mutation (Proteinkinase DNA-aktiviertes, katalytisches Polypeptid, severe combined immunodeficiency, SCID) in CB17-Mäusen durch genetische Modifikation erzielt und diese Mäuse konnten gezüchtet werden (47). Humane PBMC (48), fötales hämatopoetisches Gewebe (48) und HSCs konnten in diese Mäuse transplantiert werden. Aber die Transplantation wurde durch spontane Erzeugung von Maus T- und B-Zellen sowie NK-Zellen eingeschränkt und scheiterte infolge eines funktionsfähigen Immunsystems (50).

Der zweite Durchbruch war die Entwicklung von Non-Obese Diabetic (NOD) - SCID Mäusen im Jahr 1995 (51). Dieser Stamm zeichnet sich dadurch aus, dass er

keine murinen Lymphozyten produziert und durch die Abwesenheit von murinen NK Zellen transplantierte menschliche Zellen vom murinen Immunsystem nicht abgestoßen werden. Dazu war der *knockout* der IL-2yR Kette erforderlich (52).

Die IL-2R y-Kette ist eine entscheidende Komponente der Rezeptoren für IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21, für die Signaltransduktion. Die Abwesenheit des IL-2R y-Kette führt zur Inhibition der T- und B-Zell-Proliferation und inhibiert die NK-Zell-Entwicklung vollständig. Dieser Stamm wird vielfach benutzt, um Mäuse mit humanem Immunsystem zu züchten (53-55).

In der vorliegenden Arbeit werden NOD-scid-IL2R $\gamma^{\text{null}}$  Mäuse verwendet.

### 3.2. Balb/c-Mäuse

Balb/c Mäuse wurden bereits im Jahr 1891 von Paul Ehrlich in einer Reihe von Experimenten zur mütterlichen Übertragung der antitoxischen Immunität in der immunologischen Forschung eingesetzt. 1913 erwarb Halsey Bagg von einem kommerziellen Händler einen Bestand an Balb/c-Albino-Mäusen und verwendete sie in einem Reihen von Lernexperimenten. Bagg interessierte sich für die Genetik der Intelligenz. Somit begann er mit der Zucht einer Stammbaumlinie solcher Mäuse, die später nach ihm benannt wurden: Sie wurden Bagg-Albino-Mäuse genannt. Bei diesen Mäusen handelte es sich um die Vorfahren der Balb/c-Mäuse. Heutzutage gehören Balb/c-Mäuse zu den am häufigsten verwendeten Inzuchtstämmen in der biomedizinischen Forschung. Sie werden vor allem in der Immunologie und in der Erforschung von Infektionskrankheiten verwendet. Balb/c-Mäuse sind für eine Vielzahl an Infektionserkrankungen sehr anfällig. Dies liegt aber nicht daran, dass diese Mäuse eine Immunschwäche haben, im Gegenteil: Balb/c-Mäuse zeigen hervorragende Immunreaktionen. (56)

### 3.3. Isolierung und Transplantation von humanen Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)

Die Studie wurde von der Ethikkommission des Klinikums der LMU genehmigt und alle Spender haben eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben. Alle Tierversuche wurden von der Ethikkommission für Tierversuche der Regierung von Oberbayern genehmigt.

Es wurde Blut aus den Armvenen von gesunden Spendern, Patienten mit Atopischer Dermatitis (AD) und Colitis Ulcerosa-Patienten entnommen. Daraus wurden die menschlichen PBMC aufgereinigt. Dies geschah mittels Ficoll-Dichtezentrifugation. Je 30 ml Blut wurden in Trinatriumcitratlösung aufgenommen mit 30 ml HBBS verdünnt. Die Proben wurden in Leucosep-Röhrchen gefüllt. Die Zellen wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers 15 Minuten lang bei 800 g abzentrifugiert.

Die menschlichen PBMC wurden so isoliert, in HBSS aufgenommen und mit 2500 IE Heparin Natrium (Braun), gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) in einer Konzentration von  $20 \times 10^6$  / ml resuspendiert. Anschließend wurden 6–16 Wochen alte NOD-SCID IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen mittels intravenöser Injektion mit 200  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension transplantiert. Die erste Sensibilisierung mit Oxazolone erfolgte eine Woche nach der Transplantation.

### 3.4. Zellkultur

Humane PBMC ( $4 \times 10^6$ ) wurden in 2 ml RPMI-1640, 10% fötalem Kälberserum (FCS), 1 mM Natriumpyruvat, 1% (100 U und 100 mg) Penicillin / Streptomycin und 2% Glutamin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden anschließend 14 Tage in Platten mit IL-4 (50 ng / ml) und 1  $\mu\text{l}$  Anti-CD 40 bei 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) inkubiert.

## 3.5. Tierversuche

### 3.5.1. Studienprotokoll

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Balb/c-Mäuse wurden von Janvier Europe zur Verfügung gestellt. Die NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäuse kamen vom Charles River Labors. Alle Mäuse wurden in speziell belüfteten Käfigen unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen erhalten.

6 Wochen bis 4 Monate alte Balb/c- und NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen wurden 7 Tage nach der Transplantation mit hPMBC Zellen wie zuvor beschrieben transplantiert. Nach Anästhesie mit Isofluran wurde am Tag 1 eine 2 x 2 cm große Hautfläche in der lumbalen Region rasiert und enthaart. Die Tiere wurden durch topische Applikation von 20 ml 5% Oxazolol (4-Ethoxymethylen-2-phenyloxazolol) und 20 ml 100% Ethanol vorsensibilisiert.

Am 8. Tag danach wurden die Mäuse mit 150  $\mu\text{l}$  1% Oxazolol in 50 % Ethanol/H<sub>2</sub>O durch rektale Anwendung mit einem Ballonkatheter unter Anästhesie mit Isofluran injiziert. Die Kontrollgruppe wurde zum Zweck der Vollsensibilisierung mit Ethanol oder zur rektalen Anwendung mit 50% Ethanol/H<sub>2</sub>O behandelt. Eine zusätzliche Kontrollgruppe wurde mit isotonischer NaCl 0,9%-Lösung behandelt. Die Mäuse wurden täglich zweimal beobachtet und am 16. Tag nach der Behandlung eingeschläfert.

### 3.5.2. Bewertung der klinischen Aktivität

Die Analyse des klinischen Schweregrads der Kolitis erfolgte täglich mittels eines modifizierten Bewertungssystems. Der Verlust des Körpergewichts wurde wie folgt bewertet:

- (0) 0%,
- (1) 1–5%,
- (2) 6–10%,
- (3) 11–15% und

(4) > 15%.

Die Beurteilung der Stuhlkonsistenz wurde wie folgt vorgenommen:

- (0) normal gebildete Pellets
- (1) pastöse und halbgeformte Pellets
- (4) flüssiger Stuhl

Die Beurteilung der Blutung wurde folgendermaßen vorgenommen:

- (0) Hämokult-negativ
- (4) Hämokult-positiv

Die Beurteilung des Verhaltens wurde folgendermaßen bewertet:

- (0) normal,
- (1) verminderte Aktivität
- (3) Apathie

Die Bewertung des Gesundheitszustandes geschah wie folgt:

- (1) gekräuselt Fell
- (5) spontaner Tod.

Die IgE-Serumspiegel (ng / ml) wurden gemessen und folgendermaßen bewertet:

- (0) 0
- (1) <100
- (2) <500
- (3) > 500

Basierend auf den oben beschriebenen Parametern erfolgte eine Gesamtbewertung des Gesundheitszustandes der Versuchstiere. Hierbei wurde mit einer Skala von 0 bis 24 gearbeitet. 0 bedeutet komplett gesund, während 24 für eine maximale Aktivität der Colitis ulcerosa steht. Tiere mit einem Gewichtsverlust von > 15%

sowie solche mit einem klinischen Schweregrad von 8 und mehr wurden sofort eingeschläfert und als tot gezählt.

### 3.5.3. Bewertung der histologischen Befunde

Distale Teile des Dickdarms wurden 24 Stunden in Formalin eingelegt und somit fixiert. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit 70% Ethanol, bevor die Proben in Paraffin eingebettet wurden. Die Proben wurden mithilfe von Hämatoxylin und Eosin (H & E) sowie Massons Trichrom eingefärbt.

Die Entzündung wurde von einem ausgebildeten Histopathologen wie folgt bewertet:

- (1) Infiltration weniger Entzündungszellen in die Lamina propria (LP)
- (2) Hauptinfiltration von Entzündungszellen in die LP
- (3) konfluente Infiltration von Entzündungszellen in die LP und Infiltration der Submukosa und
- (4) transmurale Infiltration.

Die Bewertung der epithelialen Erosion wurde folgendermaßen durchgeführt:

- (0) keine Veränderung
- (1) diskrete Läsionen
- (2) oberflächliche Erosionen
- (3) Hauptschädigung der Epithelien.

Die resultierenden Bewertungsparameter wurden zu einer histologischen Gesamtbewertung im Bereich von 0 (gesund) bis 6 (maximaler histologischer Schaden) summiert.

#### 3.5.4. Bewertung der IgG- und IgE-Spiegel

Humanserum-IgG-Spiegel wurden mithilfe von Cobas Integra 800 (Roche, Penzberg, Deutschland) turbidimetrisch gemessen. Die IgE-Spiegel im Humanserum wurden mit dem Elecsys 2010 Immunoassay (Roche, Penzberg, Deutschland) ermittelt. Die IgE-Spiegel der Maus wurden mit einem Enzymimmunosorbens-Assay (ELISA) (BD Bioscience) bestimmt.

#### 3.5.5. Immunohistochemie

Darmgewebeproben wurden 24 Stunden in 4% neutral gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Antigengewinnung erfolgte durch Inkubation der Objektträger 30 Minuten lang bei 95–100 ° C in Tris-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) -Puffer (10 mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH 9).

Die unspezifische Bindung des Antikörpers wurde mithilfe von normalem Ziegenerum (1:10; MP Biomedicals, Solon, OH, USA) blockiert.

Die Schnitte wurden mit Kaninchen-Anti-Human-CD3 (1: 100; Dako, Hamburg, Deutschland) 1 Stunde in Tris-gepuffertes Salzlösung (TBS) (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6) und Kaninchen-Anti inkubiert. -human CD45 (1: 400 in TBS; Antibody Online, Aachen, Deutschland) für 1 h inkubiert.

Ein Biotin-konjugiertes Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG wurde als sekundärer Antikörper (1: 100 TBS; Dako) verwendet. Diaminobenzidin (DAB) fungierte als Chromogen. Die Schnitte wurden mit einem Leica-Mikroskop ( $\times 10$ ) analysiert und mit einer Leica-Kamera DFC 295 fotografiert. Die Analyse der mikroskopischen Aufnahmen erfolgte mithilfe der Leica FireCam-Software (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland).

## 3.6. Durchflusszytometrieanalyse

### 3.6.1. Oberflächenphänotypisierung menschlicher Lymphozyten

Die Markierung der menschlichen Lymphozyten in Mensch und Maus wurde unter Verwendung der folgenden monoklonalen Antikörper (mAbs) durchgeführt:

- Anti-Human-CD3-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (Klon SK7)
- Anti-Human-CD4-Phycoerythrin (PE) (Klon SK3)
- Anti-Human-CD8-Allophycocyanin (APC) (Klon SK1)
- Anti-Human-CD19-APC (Klon SJ25C1)
- Anti-Human-CD38-PE (Klon HIT2)
- Anti-Human-CD45-APC-H7 (Klon 2D1)
- CD56-Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex Cyaninfarbstoff 5 · 5 (PerCP-Cy<sup>TM</sup> 5 · 5)
- Anti-Human (Klon B159)
- Anti-Human CD138-FITC (Klon MI15)

Versuche mit Anti-Maus-CD45 PE-Cy 7 (Klon 30-F11) wurden ebenfalls durchgeführt, um alle murinen Wirtszellen von der Analyse auszuschließen und die Kreuzreaktivität mit menschlichen Zellen zu überprüfen. Alle mAbs (monoklonal Antibodies) wurden von BD Biosciences erworben.

Zum Zeitpunkt des Todes wurde peripheres Mausblut in Heparinröhrchen der anästhesierten Maus durch Kardiozentese gewonnen und gesammelt. Einzelzellsuspensionen wurden aus der Milz durch Zerkleinern mit einem Metallgitter gefolgt von einem 100 & mgr; m-Zellsieb (BD Biosciences) hergestellt.

Die Lymphozyten wurden nach dem Erythrozytenlyseschritt unter Verwendung von × 1 BD Pharm Lyse (BD Biosciences) gefärbt.



### 3.6.2. Isolierung und Reinigung von LP-T-Zellen

LP-T-Zellen wurden aus Proben aus dem Colon entnommen. Dies geschah unter Verwendung unter Verwendung des von van der Heijden und Stock (15) beschriebenen Protokolls.

Die Proben wurden mit HBSS CA / Mg gewaschen, um den Stuhl zu entfernen. Anschließend wurden die Proben in 5-mm-Segmente geschnitten und 15 Minuten lang bei 37°C in 5 ml HBSS (mit 2,5 mM EDTA und 2 mM Dithiothreit) zwei Mal inkubiert. Die Gewebeprobe wurden danach in 5 ml 10% RPMI-1640-Medium, das Kollagenase Typ IV (4000 U / ml; Worthington, Lakewood, NJ, USA) und DNase (1 mg / ml; Worthington) enthielt, für 90–120 min bei 37°C weiter verdaut.

Die Bestandteile in der Probe wurden durch kurzes Schütteln resuspendiert. Anschließend wurde die Probe 7 Minuten lang bei 600 g zentrifugiert, um die freigesetzten LP-T-Zellen zu isolieren. Diese wurden anschließend zweimal mit 2% RPMI-1640-Medium resuspendiert, gefolgt von einer weiteren 7-minütigen Zentrifugation bei 600 g. Das Zellpellet wurde in 2 ml eiskaltem 100% Percoll resuspendiert, mit 40% Percoll-Gradienten überzogen und 20 min bei 4 ° C mit 850 g zentrifugiert. Die aus der Interphase isolierten Lymphozyten wurden in 2 ml 2% RPMI-1640-Medium resuspendiert, gefolgt von einer 7-minütigen Zentrifugation bei 850 g. Das Zellpellet wurde in 100 mg l 10% RPMI-1640 resuspendiert. Alle Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich erworben, sofern nicht anders angegeben. Die so gewonnenen T-Zellen wurden dann mittels Durchflusszytometrie analysiert.

### 3.6.3. Intrazelluläre Phänotypisierung menschlicher Lymphozyten

Th1- und Th2-Zellen wurden gemäß ihrer Zytokinsekretion unter Verwendung eines humanen Th1 / Th2 / Th17-Phänotypisierungskits (BD Biosciences) identifiziert. Die aus Blut und Milz geernteten Lymphozyten wurden gemäß Standardprotokoll intrazellulär angefärbt.

Die Zellen wurden unter Verwendung von Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) 50 ng / ml und Ionomycin 1 & mgr; g / ml, (Sigma-Aldrich), in Gegenwart von

GolgiStop™ -Proteintransportinhibitor polarisiert und für 4-5 Stunden bei 37 ° C inkubiert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit Anti-Human-CD4-PerCP-Cy5 · 5 (Klon SK3), Human-IL-4-APC (Klon MP4-25D2) und Human-Interferon (IFN) -Glycidylmethacrylat (GMA) FITC (Klon gefärbt B27) behandelt. Die Messung wurde unter Verwendung eines fluoreszenzaktivierten Zellsortierers (FACS) Canto (BD Biosciences) durchgeführt. Die Daten nach der Erfassung wurden mit der Software FlowJo Version 7 · 6.5 (TreeStar, Ashland, OR, USA) analysiert.

### 3.7. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mithilfe des Programms R<sup>1</sup> durchgeführt. Die Gruppenmittelwerte wurden mit der Varianzanalyse (Anova) verglichen, gefolgt von Tukeys multiplen Vergleichen. Wenn die Voraussetzungen für Anova nicht erfüllt waren, wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Der Unterschied in der Überlebensrate wurde durch den Mantel-Haenszel-Test bewertet.

---

<sup>1</sup> R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.  
URL <https://www.R-project.org/>

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Auswahl der Donoren

In einer früheren Studie mit rekonstituierten NOD-SCID IL-2R $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen wurden diese topisch mit Oxazolone induziert, um Symptome hervorzurufen, die ähnlich einer Atopischen Dermatitis waren (46). In diesem Mausmodell der AD konnte gezeigt werden, dass die IgE-Spiegel mit den histologischen Scores korrelierten und dass PBMC von den AD-Patienten-Donoren hierfür unerlässlich war. Somit wurde menschliches PBMC in vitro analysiert auf die Möglichkeit, auf IL-4 zu reagieren. Dies geschah noch vor der Rekonstitution. Somit wurden die AD-Patienten hierfür ausgewählt. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass sowohl AD- als auch Colitis ulcerosa-Mausmodelle ähnlich auf eine Induktion mit Oxazolone reagieren, nämlich dass sie Symptome der jeweiligen Erkrankung aufwiesen. Diese Mäuse waren allerdings immunkompetent.

In vitro-Analysen zeigten ebenfalls, dass kultivierte PBMC aus Patienten auf eine Behandlung mit IL-4 mit einer erhöhten Ausschüttung von IgE reagierte. Die Studien in Mäusen zeigte auch dass der Krankheitshintergrund nicht entscheidend war für dieses Modell. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die Experimente auf rekonstituierte Mäuse ausgeweitet. So wurden in der vorliegenden Arbeit rekonstituierte Mäuse verwendet, bei denen die Donoren Colitis ulcerosa- Patienten waren. Die Ergebnisse wurden dann verglichen mit rekonstituierten Mäusen, deren Donoren gesunde Probanden waren und keine Colitis ulcerosa Patienten. Das menschliche PBMC wurde isoliert wie im vorangegangenen Kapitel bereits beschrieben. 4  $\times$  10<sup>6</sup> Zellen wurden für 14 Tage mit 50 ng/ml IL-4, inkubiert.

Die Induktion der Biosynthese von menschlichem IgE und IgG wurde ermittelt durch turbidimetrische Messungen. Die Reaktion auf IL-4 wurden mit denjenigen des menschlichen PBMC, das von gesunden Probanden stammte, verglichen. In allen Gruppen, sowohl Colitis ulcerosa als auch AD und gesunde Probanden, konnte eine hohe Variabilität bei der Sekretion von IgE beobachtet werden. Insgesamt waren es die Gewebe von gesunden Probanden, die auf IL-4 mit einer erhöhten Ausschüttung von IgE reagierte.

Das PBMC wurde aufgeteilt in Proben, die mit IL-4 inkubiert wurde und ohne. Dies wurde in vitro getestet. Die Sekretion von IgG unterschied sich kaum zwischen den Proben mit AD, Colitis ulcerosa und den gesunden Probanden, wenn die Proben mit IL-4 behandelt wurden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass sich die IgE-Ausschüttung signifikant erhöhte.

Die nachfolgende Abbildung zeigt repräsentative Proben der individuell ausgeschütteten IgE-Mengen in Zellkulturen.

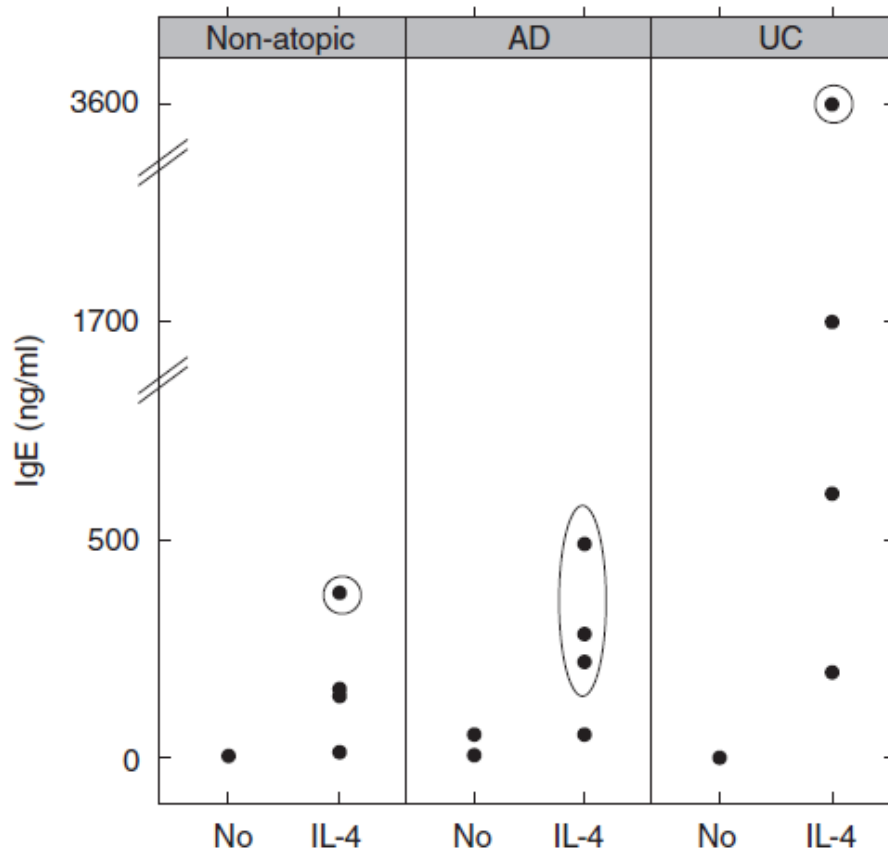


Abbildung 2: IL-4 abhängige Sekretion von IgE in menschlichem Gewebe

Quelle: Nolte et al. 2013 (46)

Die obige Abbildung zeigt die IL-4 abhängige Ausschüttung von IgE aus isolierten PBMC. Die Donoren waren Patienten mit AD (n = 4), Colitis ulcerosa (n = 4) oder gesunde Probanden (n=4). Isolierte PBMC wurden mit oder ohne IL-4 (50 ng/ml) für 14 Tage inkubiert. Die eingekreisten Punkte zeigen PBMC welche gleichzeitig rekonstituiert wurde.

## 4.2. Makroskopische Untersuchung des Colons

Sofort nach der Euthanasie der Mäuse wurde ihr Dickdarm entfernt und untersucht. Dabei wurde die Länge des Colons gemessen, und der Stuhl bewertet. Mäuse, die nicht induziert wurden, hatten eine Dickdarmlänge von 8-9,5 cm (n=8), abhängig vom Alter der Tiere. Der Stuhl dieser Versuchstiere war normal. In der Gruppe der rekonstituierten Mäuse fand sich eine hohe Variabilität. 16 Mäuse wurden mit Oxazolone und 22 mit Ethanol induziert. Das Colon mancher Mäuse zeigte keine Veränderung, während bei anderen Versuchstieren eine moderate Reduktion (ca. 1 cm) der Colongänge zu beobachten war. Der Stuhl hatte hierbei seine typische Form verloren. Es waren keine festen Bällchen mehr zu sehen, diese waren deutlich vergrößert.

Der histologische Score (siehe Kapitel 3) wurde bestimmt und dabei wurden die Veränderungen deutlicher. Es konnte kein signifikanter Unterschied, zwischen den mit Oxazolone oder mit Ethanol induzierten Mäusen festgestellt werden. Die nicht-rekonstituierten Mäuse verstarben alle bei der Induktion. Sie mussten vorzeitig getötet werden. Sie zeigten eine deutliche Reduktion der Dickdarmlänge (2 cm und mehr).

Die Induktion mit Oxazolone führte zur Entwicklung klinischer Symptome einer Colitis ulcerosa. Die Symptome wurden gemäß des in Kapitel 3 beschriebenen Scores klassifiziert. Die Tiere wurden mit NaCl (n=4), mit Ethanol (n=22) und mit Oxazolone (n=21) behandelt.  $P = 0,008$  im Vergleich zwischen Oxazolone und NaCl,  $P = 0,3$  im Vergleich zwischen Ethanol und NaCl und  $P = 0,002$  für Oxazolone versus Ethanol. In der nachfolgenden Abbildung ist der Kaplan-Meier-Plot für rekonstituierte Mäuse behandelt mit NaCl (+ PBMC NaCl, n = 4), ethanol (+ PBMC Ethanol, n = 23) und Oxazolone (+ PBMC Oxazolone, n = 29) und von nicht-rekonstituierten Mäusen, behandelt mit Oxazolone (- PBMC Oxazolone, n = 8) abgebildet. Die Überlebensrate, die mit einem Mantel-Haenszel Test berechnet wurde, unterschieden sich im Gruppenvergleich signifikant ( $P = 0,03$ ).

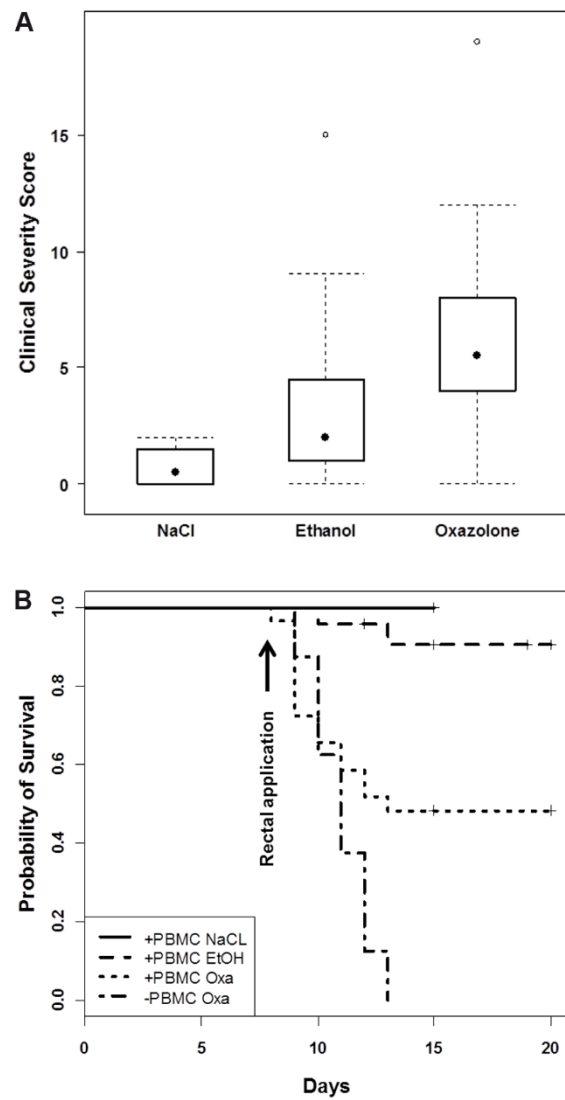


Abbildung 3: A) Box plots, Klinischer Schweregrad. B) Kaplan Meier Plots, Überlebensraten. Quelle: Nolte et al. 2013 (46)

Die makroskopische Untersuchung des Dickdarms im Rahmen einer Autopsie ergab Verkürzungen des Darms bei den Mäusen, die mit Oxazolone behandelt wurden, wie in Abb. 4a gezeigt.

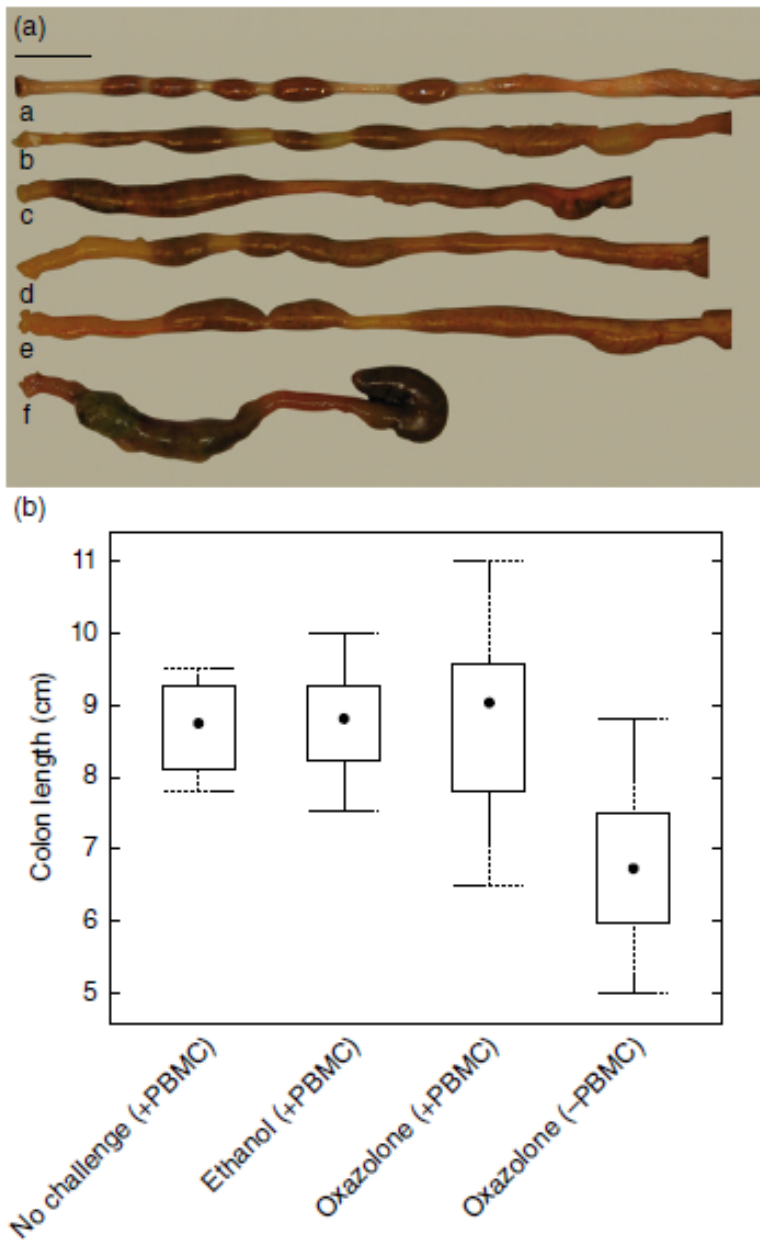


Abbildung 4: Makroskopische Untersuchung des Colons. 2013 (46). a) (NOD-SCID  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen, rekonstituiert und mit NaCl behandelt. b) Rekonstituierte Mäuse, die mit Ethanol behandelt wurden (Histologischer Score = 1); (c) Rekonstituierte Mäuse, die mit Ethanol behandelt wurden (Histologischer Score = 3) d) Rekonstituierte Mäuse, die mit Oxazolone behandelt wurden (Histologischer Score= 4) e) Rekonstituierte Mäuse, die mit Oxazolone behandelt wurden (Histologischer Score = 6) f) nicht-rekonstituierte Mäuse. *Quelle: Nolte et al.* b) Box-plot, Colon Länge. Vergleich zwischen nicht-rekonstituierten und rekonstituierten Mäusen bei unterschiedlichen Behandlungsarten.

### 4.3. Histologische Untersuchung des Colons

Um die histologischen Veränderungen des Colons aufgrund der Oxazolone-Induktion zu untersuchen, wurden Paraffin-Schnitte aus dem distalen Colon mit H&E sowie Massons Trichrome angefärbt. Wie in der nachfolgenden Abbildung gezeigt wird, resultiert eine Induktion mit Oxazolone in schweren pathomorphologischen Veränderungen des Colon-Aufbaus in beiden Mausmodellen, so wohl Balb/c als auch NOD-SCID IL-2R $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen. Das Colon der Mäuse zeigte ähnliche Veränderungen wie bei Colitis ulcerosa: Lücken in der Epithelschicht, Ödembildung in der Lamina propria und der Mucosa sowie die Infiltration mit entzündungsvermittelnden Immunzellen.

Eine Behandlung mit Oxazolone resultiert somit in Beschädigungen der Epithelschicht, führt zu Ödemen und der Infiltration von entzündungsfördernden Immunzellen in die Mukosa und die Lamina propria. In der nachfolgenden Abbildung sind Schnitte des distalen Teils des Colons zu sein, eingebettet in Paraffin.



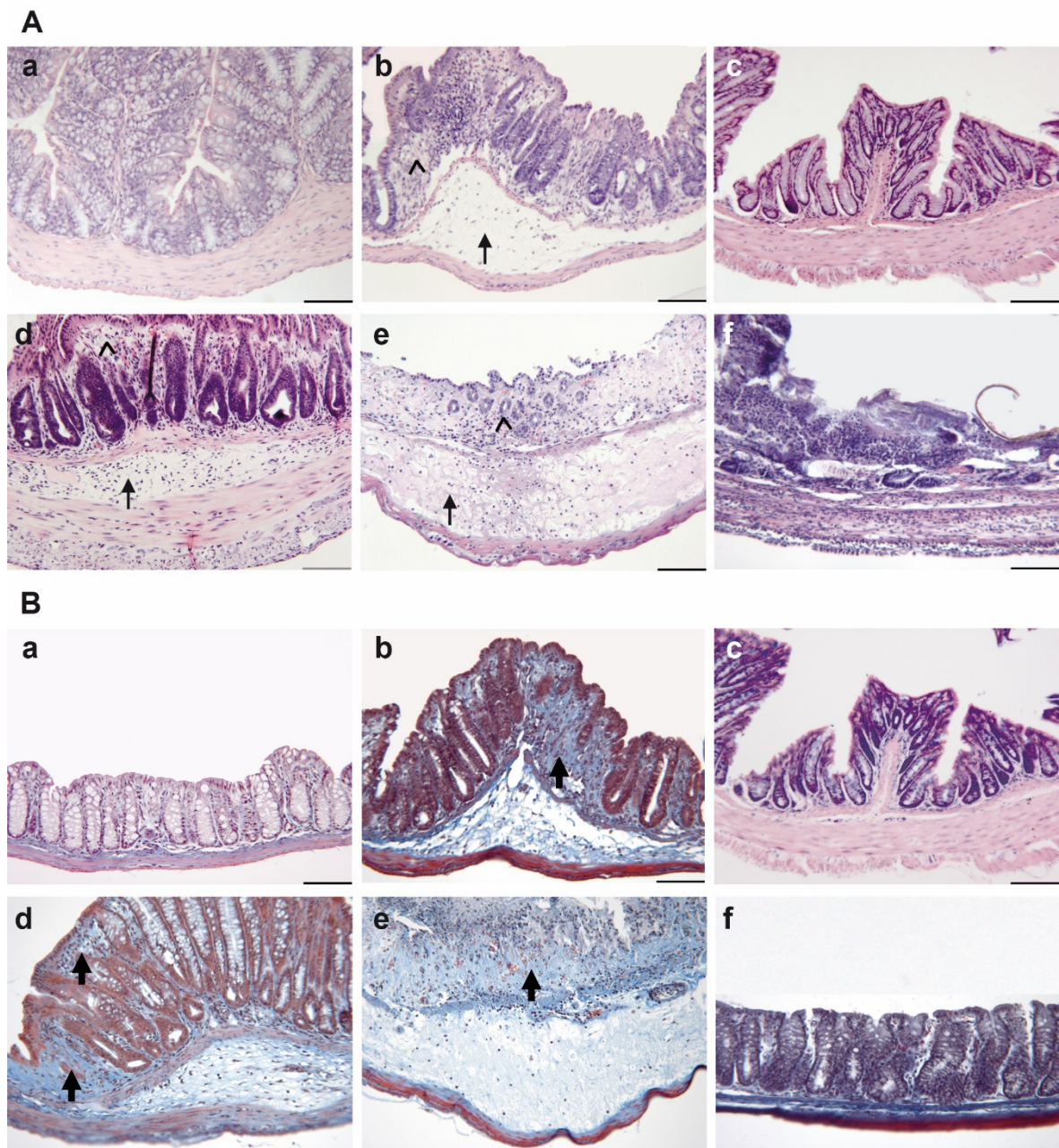


Abbildung 5: Colon-Schnitte in Paraffin, Auswirkungen von Oxazolone. (a) Masson's Trichrom (b) BALB/c-Mäuse behandelt mit (a) ethanol (b) Oxazolone; (c) NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen, nicht induziert (d) NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen, behandelt mit Oxazolone, Histologischer Score = 4 (e) rekonstituierte NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen, behandelt mit Oxazolone, Histologischer Score = 8 (f) nicht rekonstituierte NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäuse, behandelt mit Oxazolone. Quelle: Nolte et al. 2013 (46)

Serienschnitte zeigten eine kontinuierliche Entzündung, wobei es keine Mikroabszesse gab. Der Grad der Beschädigungen war variabel. Die obige

Abbildung zeigt zwei histologische Proben von Mäusen mit jeweils einem histologischen Score von 4 und 8. Die Zell-Infiltrate bestanden aus einer Mischung von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten. Dabei konnte allerdings ein signifikanter Unterschied zwischen Balb/c und rekonstituierten NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen festgestellt werden. Dabei handelt es sich um den Unterschied beim Ethanol-Vehikel. Während Balb/c Mäuse nicht auf eine rektale Behandlung mit Ethanol-Vehikel reagierten, fanden sich bei den NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen histopathologische Veränderungen, wie es bei den Oxazolone-induzierten Tieren der Fall war. Wie schon aufgrund der visuellen Untersuchung des Colons erwartet, waren die Dickdärme der nicht-rekonstituierten NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen schwer beschädigt. In den meisten Fällen hatte sich die Epithelschicht komplett abgelöst, wie oben zu sehen ist (Abb. 5f).

Wie erwartet, waren das Colon der nicht-induzierten Mäuse, die mit PBMC von Colitis ulcerosa Patienten rekonstituiert waren, gesund. Da Fibrose das Kennzeichen einer Colitis ulcerosa ist, wurden die Colon-Schnitte der gesunden und der induzierten Tiere auch mit Massons Trichrome angefärbt. Wie oben zu sehen ist Oxazolone führte zur Fibrose in Balb/c Mäusen sowie in rekonstituierten NOD-SCID IL-2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen (Abb 5b, d,e).

Es konnten darüber hinaus Kollagen-Fibrillen im extrazellulären Ödem und in den Epithelschichten detektiert werden. Im Gegensatz dazu, konnte keine Fibrose bei nicht-rekonstituierten NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen, die mit Oxazolone behandelt wurden, festgestellt werden. Die histologischen Scores der Colons von rekonstituierten NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen sind in der nachfolgenden Abbildung gezeigt, auch die histologischen Scores von NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen sind in der nachfolgenden Grafik abgebildet.

Mäuse, die mit Oxazolone oder Ethanol behandelt wurden, zeigten Veränderungen unterschiedlichen Ausmaßes mit einem medianen histologischen Score von jeweils 6 und 4. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit isotonischer NaCl Lösung nicht zu Veränderungen. Die Pfeile in der Abbildung 5 kennzeichnen die Ödeme, die fettgedruckten Pfeile weisen auf Fibrosen hin.

Die histologischen Veränderungen wurden klassifiziert und in der Abbildung 6 dargestellt.

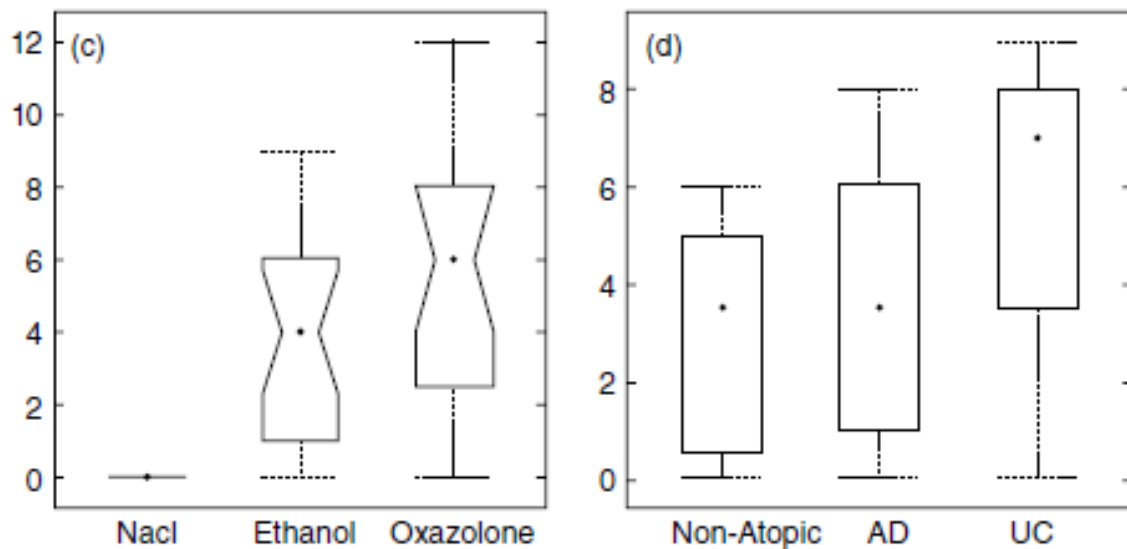


Abbildung 6: Box-Plots der histologischen Veränderungen. (c) Rekonstituierte NOD-scid IL2R  $\gamma^{null}$  Mäusen, behandelt mit isotonischem NaCl (n=4), Ethanol (n=17) und mit Oxazolone (n=16). Für den Vergleich von Oxazolone versus NaCl wurde ein Kruskal–Wallis-Test durchgeführt (d) Krankheits-abhängige Entwicklung der Histologischen Scores als Konsequenz der Behandlung mit Ethanol (nicht atopisch n=8, atopische Dermatitis n=11, Colitis ulcerosa n=4). Quelle: Nolte et al. 2013 (46)

Die histologischen Scores in den drei Gruppen unterschieden sich signifikant. ANOVA und der Turkey's-Test ergaben signifikante Unterschiede zwischen der Oxazolone-Gruppe und der NaCl-Gruppe ( $P = 0,01$ ). Der Unterschied zwischen der Ethanol-Gruppe und der NaCl-Gruppe war nicht signifikant ( $P = 0,1$ ). Es gab eine Korrelation zwischen dem klinischen Schweregrad und des histologischen Scores ( $P = 0,001$ , Pearson's product-moment correlation). Die Reaktion auf Ethanol war deutlich stärker bei Mäusen, die mit PBMC von Colitis ulcerosa rekonstituiert wurden als bei solchen, die PBMC von gesunden Menschen erhalten hatten.

#### 4.4. Immunohistochemische Analysen

Infolge der Induktion mit Oxazolone werden in den Tieren menschliche T-Zellen aktiviert. Diese infiltrieren die Mukosa und die Lamina propria der Tiere. In der

nachfolgenden Abbildung sind die photoimmunochemischen Färbungen von Paraffin-Schnitten der Versuchstiere veranschaulicht:

Immunohistochemische Analysen der zellulären Infiltrate zeigten, dass entzündungsvermittelnde Immunzellen menschlichen Ursprungs waren. Meist handelte es sich um T-Zellen. Ein Antikörper, der sich gegen menschliche CD45-positive Leukozyten in der Lamina propria richtete, verursachte in rekonstituierten NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen pathomorphologische Veränderungen, wie in der nachfolgenden Abbildung (d,e) zu sehen ist. Entzündungsvermittelnde Zellen wurden in Sektionen der Balb/c-Mäuse nicht mit diesem Antikörper angefärbt (b)

Ein Antikörper, der gegen CD3 gerichtet war, identifizierte den Großteil der infiltrierenden Zellen als T-Zellen. Dieser Antikörper erkennt humane und murine T-Zellen. Dickdärme von Balb/c-Mäusen, die mit Oxazolone induziert wurden, wiesen dabei ebenfalls angefärbte Zellen auf, wie in der nachfolgenden Abbildung gezeigt wird.

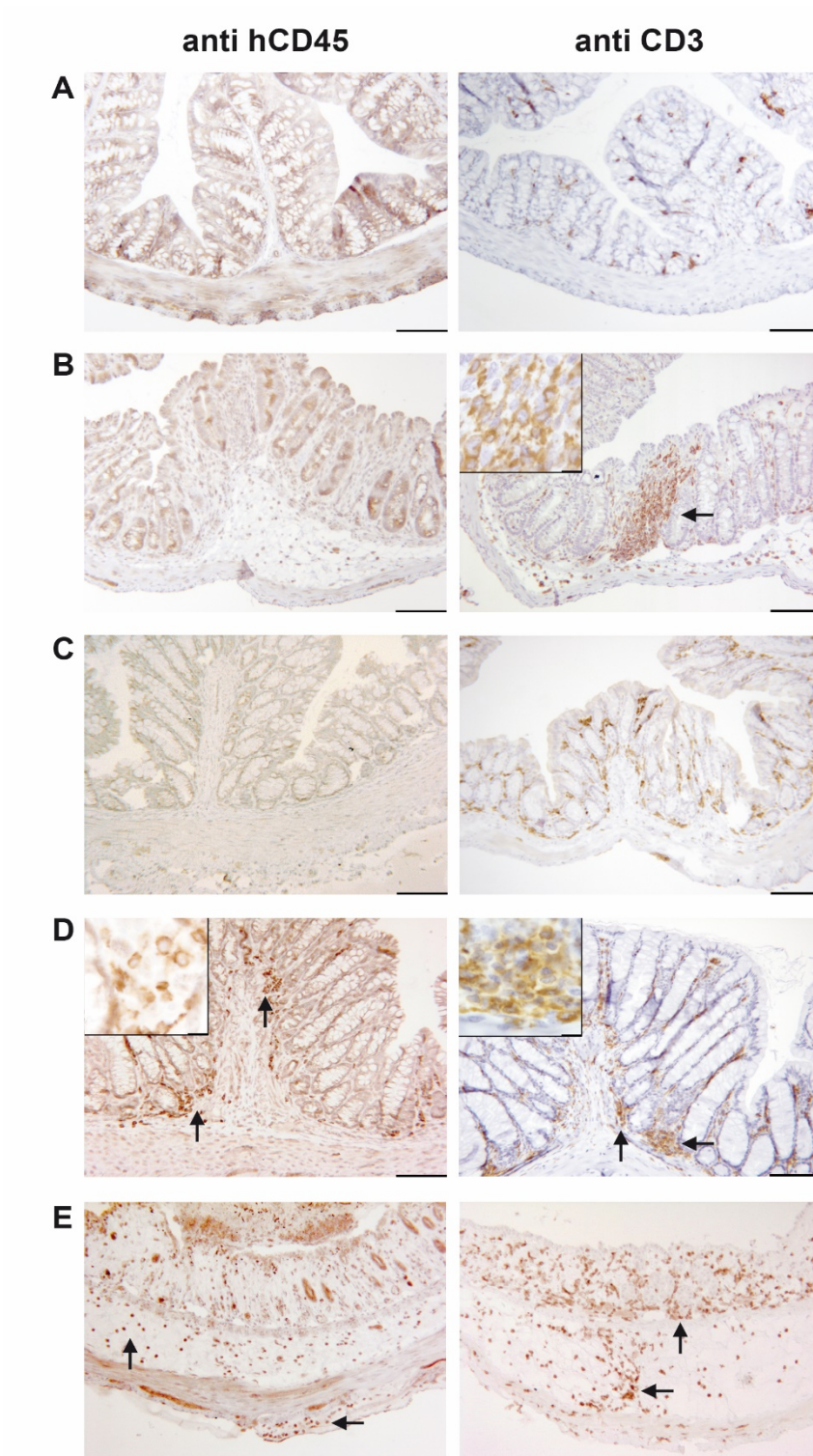


Abbildung 7: Immunhistochemische Proben der mit Oxazolone behandelten Versuchstiere. Die Proben wurden mithilfe von anti-hCD45 und anti-CD3 Antikörper eingefärbt. A) Balb/c-Mäuse, die mit Ethanol induziert wurden und B) mit Oxazolone C) nicht rekonstituierte NOD-scid IL2R  $\gamma^{null}$  Mäusen, behandelt mit Oxazolone D) Histologischer Score = 4 E) Histologischer Score = 8. Quelle: Nolte et al. 2013 (46)

Darüber hinaus wurde die IgE-Sekretion der Versuchstiere infolge der Induktion mit Oxazolone oder Ethanol überprüft.

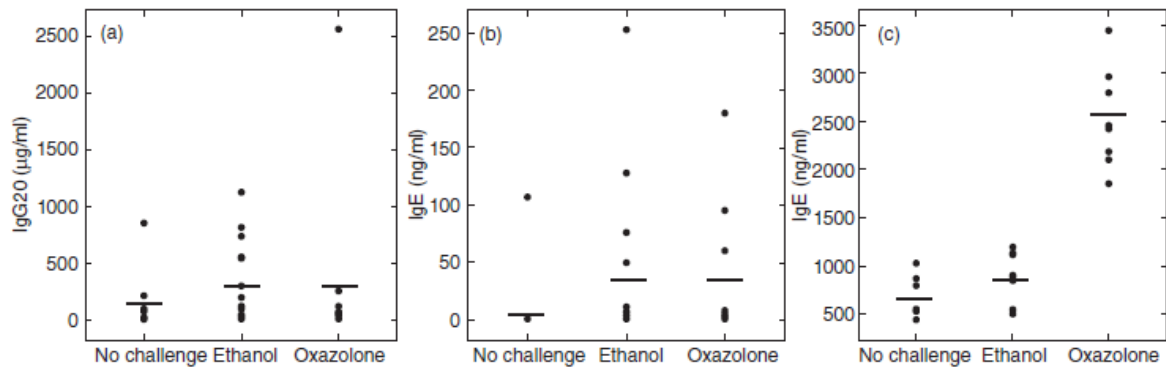


Abbildung 8: Dot plots mit Median. IgE-Sekretion infolge der Behandlung mit Oxazolone oder Ethanol. (a) hIgG, (b) hIgE in Seren von nicht rekonstituierten, NOD-scid IL2R  $\gamma^{null}$  Mäusen (ohne Induktion, n = 15, Ethanol, n = 22, Oxazolone n = 15). (c) BALB/c Mäuse (ohne Induktion n = 9, Ethanol, n = 8, Oxazolone, n = 8). Die Balken repräsentieren Durchschnittswerte. Quelle: Nolte et al. 2013 (46)

Die Induktion mit Oxazolone induziert die Expression von Periostin. Es wurden Photomikrogramme von immunochemischen Färbungen der Paraffin-Sektionen aufgenommen. Es wurde mithilfe von Anti-Periostin-Antikörpern gefärbt.

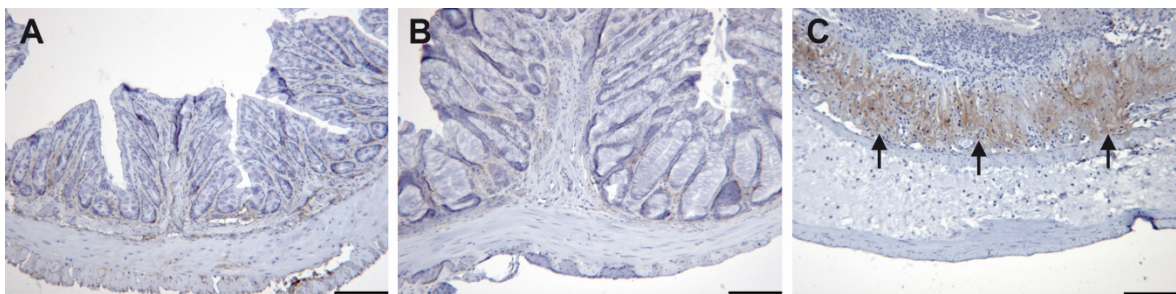


Abbildung 9: Paraffin-Sektionen mit Anti-Periostin angefärbt. (a) Nicht rekonstituierte, NOD-scid IL2R  $\gamma^{null}$  Mäusen (b) Rekonstituierte NOD-scid IL2R  $\gamma^{null}$  Mäusen, die mit Oxazolone induziert wurden, Histologischer Score = 4 (c) Rekonstituierte NOD-scid  $\gamma^{null}$  Mäusen, mit Oxazolone behandelt, Histologischer Score = 8. Quelle: Nolte et al. 2013 (46)

#### 4.5. Analyse der menschlichen T-Zellen in der Milz und im Blut der Mäuse

Um die T-Zellen in rekonstituierten Mäusen mit PBMC von Colitis ulcerosa Patienten zu untersuchen, wurden die menschlichen Lymphozyten aus der Milz und dem Blut der Mäuse isoliert. Das Blut der Mäuse wurde mittels fluorescence activated cell scanning (FACS) analysiert. Die Anzahl der menschlichen Milz-CD45<sup>+</sup> Zellen in Prozent diente dazu, um das Ausmaß der Rekonstitution zu bestimmen. Dieses variierte erheblich in allen Gruppen von Mäusen zwischen 0,15 bis 81,5%, (Median = 6,7%). Ein Rekonstitutions-Level unter 1% wurde als unzureichend eingestuft, und die betroffenen Tiere wurden von der Studie ausgeschlossen. Dies war bei zwei Tieren in der Kontrollgruppe und einem Tier in der Ethanol-Gruppe der Fall.

Der Verhältnis von CD4 : CD8 Zellen wurde mittels Oberflächen-Phänotypisierung mithilfe von Anti-CD4 und Anti-CD8 bestimmt. Das Verhältnis von Th2 : Th1 wurde mittels intrazellulärer Phenotypisierung bestimmt. Die errechneten Verhältnisse wurden mit der Blutprobe der Patienten verglichen.

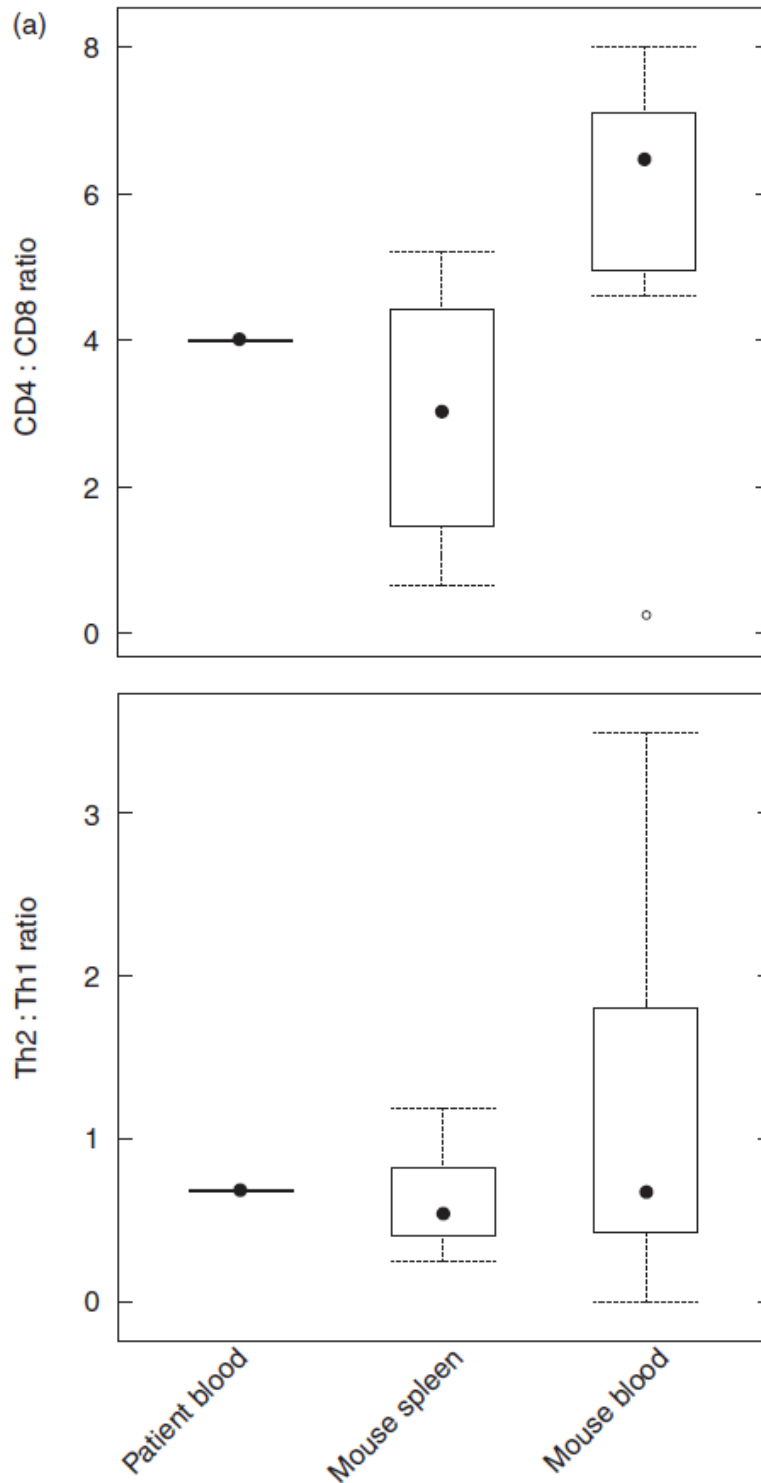


Abbildung 10 (oben): Verhältnis CD4 zu CD8 Zellen. Abbildung 11 (unten): Verhältnis von Th2:Th1 Zellen. Quelle: Nolte et al. 2013 (46)

Wie oben gezeigt, ist das Verhältnis in der Blutprobe der Mäuse sehr hoch, sowohl CD4:CD8 als auch Th2:Th1 (jeweils 4 und 0,68), verglichen mit der Blutprobe von



Colitis ulcerosa Patienten und gesunden Probanden. Hierbei war CD4 : CD8 zwischen 1·5 und 2·4 und das Verhältnis von Th2 : Th1 belief sich auf zwischen 0·04 bis 0·08.

Die hohen Quotienten bei den Mäusen zeigten sich bei allen Versuchstieren, sowohl in der Milz als auch im Blut. Die Induktion hat diese Verhältnisse nicht beeinflusst.

Um die erwähnten pathomorphologischen Veränderungen durch Oxazolone zu bestätigen, wurden menschliche T-Zellen, natürliche Killer-(NK)-T-Zellen und NK-Zellen mittels FACS in Zellsuspensionen aus dem Colon identifiziert. Dabei wurden Antikörper gegen das menschliche CD3 und CD56 verwendet.

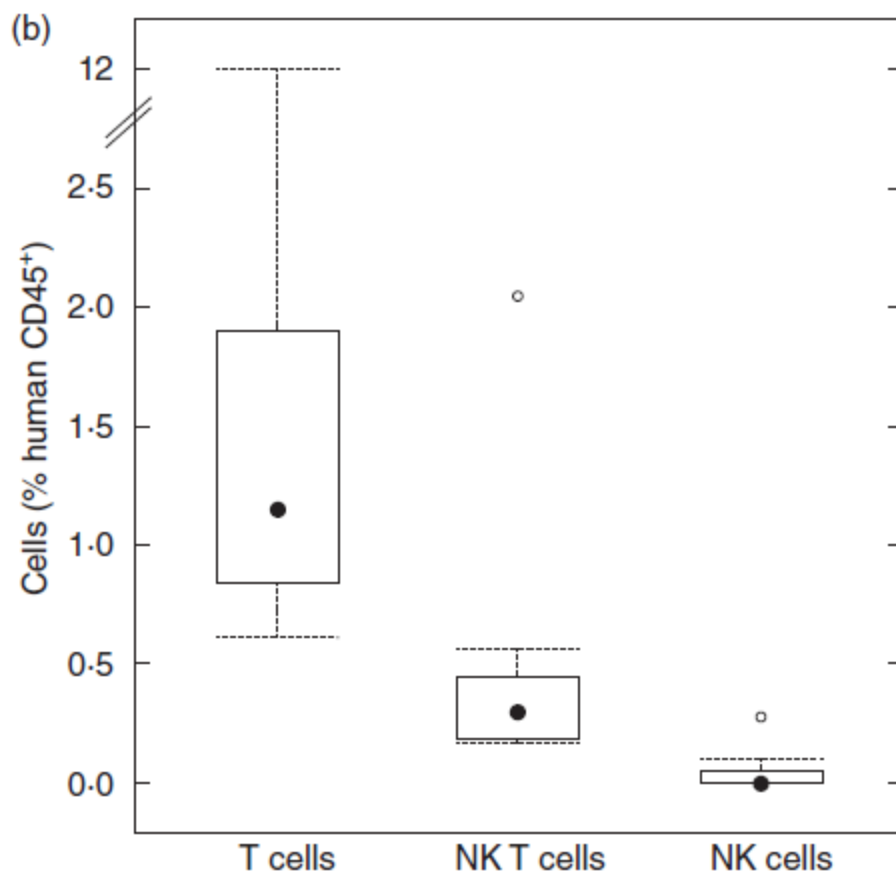


Abbildung 12: Identifikation von menschlichen T-Zellen, NK-T Zellen und NK Zellen. Quelle: Nolte et al. 2013 (46)

Wie in Abbildung 12 gezeigt repräsentieren die T cells 1,1% der menschlichen CD45+ Zellen. 0,3% der menschlichen CD45+ Zellen sind dabei NK T Zellen, wobei NK Zellen nicht detektiert werden konnten.



## 5. Diskussion

Colitis Ulcerosa ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, welche die Schleimhaut des Dickdarms und des Rektums schädigt. Die Ätiopathogenese der Colitis ulcerosa ist bis heute noch nicht im Detail geklärt. Studien haben ergeben, dass vor allem genetische und Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Insbesondere steht die bakterielle Mikroflora im Fokus (5, 15,16).

Die vorliegende Arbeit beschreibt ein Tiermodell für Colitis ulcerosa. In der vorliegenden Studie wurde Colitis ulcerosa mittels Oxazolol und Ethanol in NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen, die mit PBMC rekonstituiert wurden, induziert. Durch die Induktion mit entweder Oxazolol oder Ethanol entwickelten die rekonstituierten Mäuse dieselben Symptome und denselben Phänotyp wie ein Patient mit Colitis ulcerosa, dies war auch bei immunkompetenten Mäusen der Fall, die mit von Oxazolol behandelt wurden.

Die Schwere der klinischen Manifestation, die Entwicklung von Ödemen, die Schädigung der Epithelschicht, Fibrose und die erhöhte Anzahl an entzündungsvermittelnden Zellen waren ähnlich wie bereits in mehreren vorherigen Studien mit C57/BI/10 und Balb/c-Mäusen durchgeführt wurden (57-59). Ebenso entsprachen die vorliegenden Ergebnisse denjenigen, die bereits mit Balb/c-Mäusen durchgeführt wurden. Ein hoher Anteil der infiltrierenden Zellen war menschlichen Ursprungs. Hierbei handelte es sich vorwiegend um T-Zellen. Infolge der Induktion mit Oxazolol oder Ethanol migrierten die T-Zellen in die Epithelschicht des Colons und Rektums. Im Gegensatz zu einer früheren Studie (46) war die Krankheitsentwicklung nicht abhängig vom Gesundheitszustand und der Manifestation der Erkrankung des Donors. Mäuse, die mit PBMC von gesunden Donoren rekonstituiert wurden, zeigten ähnliche Reaktionen auf die Induktion mit Oxazolol oder Ethanol.

Rekonstituierte NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen sind nicht dazu befähigt, ein peripheres Immunsystem zu entwickeln. Somit können diese Mäuse auch keine volle Immunantwort auf Fremdkörper entwickeln. Eine mögliche Erklärung für die Immunantwort und die Aktivierung des Immunsystems bei den betroffenen Mäusen könnte in der Wirkungsweise des Oxazolons liegen. Oxazolol kann über den STAT

6 Signalweg die Sezernierung von Keratinozyten und Chemokine stimulieren. Aus diesem Grund können Lymphozyten auf diese Stimulierung reagieren.

Die FACS-Analysen in der vorliegenden Arbeit ergaben eine hohe Anzahl an T-Zellen im Gewebe des Colons. Darüber hinaus konnte eine hohe Anzahl an NK T Zellen gefunden werden. NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen, die mit menschlichem PBMC rekonstituiert wurden, haben sich inzwischen zu einem geeigneten Modell für den Vergleich zwischen Xeno- und Donor-Erkrankung entwickelt. Die Entwicklung von Xeno-GVHD erfordert cyto-reduktive und konditionierende Regimes. Darunter fallen auch Radiotherapie oder Chemotherapie, welche einen Überschuss an Zytokinen verursachen. Insbesondere sind hierbei die proinflammatorischen IL-1-Zytokine zu erwähnen. Darüber hinaus spielt auch der Tumor-Nekrose-Faktor hierbei eine wichtige Rolle und wird infolge der Behandlung vermehrt sezerniert (5, 13).

Beide Zytokine verursachen erhebliche Schäden im Colon und Rektum, sogar im gesamten gastrointestinalen Trakt. Infolgedessen können mikrobielle Produkte, Bakterien, Viren sowie Lipopolysaccharide in die Mukosa eindringen. Dies führt zur Aktivierung der T-Zellen. Jedoch ist GVHD im Gegensatz zu einer Oxazolol-induzierten Colitis ulcerosa durch eine erhöhte Sekretion von Zytokinen aus Th1-Zellen sowie durch einen erhöhten Präsenz von NK Zellen charakterisiert. In der vorliegenden Studie konnten keine NK-Zellen gefunden werden. Allerdings wurde eine erhöhte Ausschüttung von IL-13 beobachtet. Insgesamt kann gesagt werden, dass das Mausmodell in der vorliegenden Arbeit einer menschlichen Colitis ulcerosa entspricht und dass der Phänotyp in der Maus eine Colitis ulcerosa simuliert, bzw. bei den Mäusen eine Colitis ulcerosa ausgelöst werden konnte.

Wir haben beobachtet, dass dieses Tiermodell nicht abhängig von PBMC der Colitis ulcerosa-Patienten ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Hypothese. Die Untersuchung wurde mittels Zellkulturen durchgeführt. Weitere Experimente mit atopischen Spendern wären hilfreich, um zu untersuchen, welche Eigenschaften für die Entwicklung des Colitis ulcerosa Phänotyps erforderlich sind.

Darüber hinaus konnte im Rahmen von anderen Studien gezeigt werden, dass Zytokine die Donor-T-Zellen in Th2-Zellen polarisieren und somit das Vorhandensein von GVHD reduzieren (60-62). In der vorliegenden Arbeit konnten

erhöhte Verhältnisse zwischen CD4 und CD8-Zellen sowie Th1 und Th2-Zellen beobachtet werden. Die Th-1 Quotienten, die in rekonstituierten Mäusen gefunden wurden, unterstützen zusätzlich die Ergebnisse der vorliegenden Studie.

Allerdings konnten entscheidende Unterschiede in den Ergebnissen bei den Oxazolone-induzierten Balb/c-Mäusen gefunden werden. In ersten Linien lagen die Unterschiede in der Immunantwort. Diese war in Balb/c-Mäusen auf die mit Oxazolone behandelte Gruppe beschränkt. Die murinen IgE-Level erhöhten sich im Verlauf des Experimentes und veränderten sich in Ethanol-induzierten Mäusen kaum. Infolgedessen wurden keine Veränderungen im Darm dieser Kontrollgruppe beobachtet.

Bei den rekonstituierten NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen fanden ähnliche Immunantworten statt, ob diese nun mit Oxazolone oder mit Ethanol induziert wurden. Die histologischen Scores und die Sekretion von menschlichem IgE waren bei Oxazolone und Ethanol-Induktion ähnlich. Eine mögliche Interpretation dieses Ergebnisses könnte sein, dass das menschliche PBMC über eine Art „Immungedächtnis“ verfügt und dementsprechend sowohl auf Oxazolone als auch auf Ethanol reagiert, allerdings könnte es sich bei Ethanol um eine Art allergische Reaktion handeln. Das Immunsystem des Donors könnte das Ethanol als ein Kontaktallergen „erkennen“ und eine entsprechende Immunantwort induzieren.

Eine andere mögliche Erklärung könnte sein, dass die NK T-Zellen auf die proteindenaturierende Eigenschaft des Ethanols reagieren. So könnten die proteindenaturierende Eigenschaft des Ethanols die NK T-Zellen stimulieren. Eine prospektive Kohortenstudie mit Colitis ulcerosa Patienten, die sich in Remission befanden, hat ergeben, dass Alkoholkonsum die Wahrscheinlichkeit einer Rezidivierung des Erkrankungsschubes signifikant erhöht (63). Somit könnte eine mögliche Erklärung der Ergebnisse darin liegen, dass Ethanol ein Rediziv induziert. Diese Ergebnisse stützen daher die Hypothese, dass die betroffenen Mäuse auf das Ethanol gerade aus diesem Grund reagieren und dass das Ethanol unter Umständen eine Rezidivierung auslösen könnte.

Es wurde PBMC von Colitis ulcerosa Patienten verwendet. Somit könnte der Grund darin liegen, dass bei den Mäusen durch Ethanol die Manifestation einer Colitis ulcerosa ausgelöst wird und die Mäuse somit auf das Ethanol mit den

entsprechenden Symptomen reagieren. Die Reaktion auf das Ethanol war genau so stark wie diejenige auf das Oxazolone.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass die Variabilität der menschlichen IgE-Level bei rekonstituierten NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen viel höher ist als wenn sie nicht rekonstituiert worden wären. Genau diese Variabilität könnte auch der Grund dafür sein, warum die Rekonstitution bei manchen Tieren deutlich schlechter funktioniert als bei anderen. Der Erfolg der Rekonstitution unterscheidet sich zwischen den NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen erheblich. Auch die Induktion kann bei diesen Mäusen unterschiedlich verlaufen und mehr oder weniger erfolgreich sein.

Bei den NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen variiert die Reaktion auf die induktiven Substanzen sowie der Erfolg der Rekonstitution erheblich, verglichen mit den Balb/c-Mäusen. Dies stellt einen wichtigen Punkt dar, wenn es darum geht, ein geeignetes Tiermodell zu rekonstruieren. Eine frühere Studie hat gezeigt, dass die menschlichen IgE-Level in rekonstituierten Tieren erheblich variieren (46). Anschließend nach der Induktion verbleiben sie für etwa 23 Tage bei rekonstituierten Tieren unverändert (46).

Infolgedessen sollten keine erheblichen Variationen in den IgE-Spiegeln bei den rekonstituierten Tieren nach der Induktion zu erwarten sein, denn diese wurden in der vorliegenden Studie bereits nach 13 Tagen untersucht. Allerdings sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dafür, dass die Sekretion des menschlichen IgE kein Indikator für die Manifestation und den Phänotyp der Erkrankung ist. Es wurde keine Korrelation zwischen den Mengen an menschlichem IgE und dem Phänotyp sowie der Manifestation der Erkrankung gefunden. Somit stellt der Spiegel von menschlichem IgE keinen Indikator bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiermodellen dar.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen beim Menschen. Auch bei Menschen ist die Colitis ulcerosa nicht durch erhöhte IgE-Spiegel charakterisiert (46). Allerdings ist das bei der Atopischen Dermatitis nicht der Fall. Eine frühere Studie zeigte, dass die Manifestation und der Phänotyp der Erkrankung mit den IgE-Spiegeln korrelieren (46).

Die Variabilität in NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen wurde in einer früheren Studie untersucht (46, 64). Es gab dabei Mäuse, die mit dem PBMC von Patienten mit

Atopischer Dermatitis (AD) rekonstituiert wurden, die auf die Induktion gar nicht reagiert haben. Andererseits gab es auch wiederum Mäuse, die eine sehr starke Reaktion aufwiesen. Die große Herausforderung und auch Schwierigkeit im Experiment war es, dass nicht abzusehen war, wie die Mäuse auf die Behandlung reagieren würden. Es war auch nicht klar, welche Tiere nun eine Reaktion zeigten und welche nicht (46, 64).

Eine mögliche Erklärung für diese erhebliche Variabilität unter den Versuchstieren kann das stark unterschiedliche Ausmaß der Besiedlung mit humanen PBMC sein. Der Erfolg der Rekonstitutionen war unter den Versuchstieren ebenfalls stark variabel. Es konnten Werte zwischen 0,2 % und 73 % erreicht werden (64). Dies spiegelt sich auch in der Variabilität der IgE-Spiegel wider.

Tatsächlich konnte in einer früheren Studie eine Korrelation zwischen dem Ausmaß und dem Erfolg der Rekonstitution und dem IgE-Spiegel gefunden werden (46). Die Autoren der Studie konnten zeigen, dass, wenn das Level des humanen IgGs, das die Mäuse sezernierten, das Basislevel, welches alle der Tiere in diesem Experiment erreichten, überschritt, dann auch fast immer eine Sekretion von menschlichem IgE beobachtet werden konnte. Allerdings konnte keine Korrelation zwischen den Spiegeln von IgG und IgE festgestellt werden. Demnach reicht eine ausreichende Rekonstitution nicht aus, um eine gewünschte Immunreaktion in den Versuchstieren hervorzurufen. Die Autoren der Studie erklären die erhöhten IgG Werte mit einem unzureichenden, bzw. unvollständigen IgM/IgG4/IgE *switch*. Eine weitere mögliche Erklärung für die Variabilität unter den Versuchstieren kann auch eine nicht zureichende oder eine verzögerte Immunstimulation sein (46).

Ein weiteres Ergebnis, das in der vorliegenden Studie auffiel und auch so nicht erwartet worden war, war, dass sich Oxazolone für nicht rekonstituierte Mäuse als hochgradig toxisch erwies, wenn es rektal appliziert wurde. Keines der betroffenen Tiere überlebte das Experiment – alle verstarben. Anders verhielt es sich mit den Mäusen, die rekonstituiert worden waren.

Während die nicht rekonstituierten Mäuse verstarben, reagierten manche der rekonstituierten Mäuse, denen Oxazolone rektal appliziert wurde, kaum auf die Substanz. Sie blieben symptomfrei oder wiesen nur eine geringe Symptomatik auf. Auch die Analyse des Colons der betroffenen Mäuse bestätigte dieses Ergebnis. Bei

den Tieren, die kaum oder gar nicht auf das Oxazolol reagiert hatten, fanden sich keine oder nur geringe histologische Befunde für Colitis ulcerosa.

Die Analyse der Länge des Colons untermauerte das Ergebnis zusätzlich. Bei den Mäusen, die nicht rekonstituiert worden waren, und die Oxazolol rektal appliziert bekamen, fand sich eine signifikante Verkürzung des Darmes, wie Heller et al. (2002) in ihrer Studie bereits feststellen konnten. Im Gegensatz dazu konnten bei den rekonstituierten Tieren lediglich moderate bis geringe Verkürzungen des Colons beobachtet werden (46). Heller et al. (2002) betonen allerdings, dass die Länge des Colons kein Schlüsselmerkmal dieses Tiermodells darstellt (46).

Die vorliegende Studie zeigte auch, dass bei den nicht rekonstituierten Tieren, denen Oxazolol rektal appliziert worden war, die Darmmukose vollständig abgebaut und zerstört war. Darüber hinaus wurden keine Anzeichen einer Fibrose gefunden. Somit schützen menschliche PBMC die Versuchstiere vor der Toxizität von Oxazolol.

Die betroffenen Tiere scheinen durch menschliche PBMC in der Lage zu sein, den toxischen Effekt des Oxazolol zu reduzieren oder sogar komplett zu eliminieren. So überlebten 50 % der rekonstituierten Versuchstiere, die mit Oxazolol rektal behandelt worden waren. Makroskopische Untersuchungen zeigten lediglich einen moderaten Effekt auf das Colon der betroffenen Tiere. Aus diesen Resultaten ergibt sich die Hypothese, dass die in der vorliegenden Studie beobachteten Symptome in rekonstituierten Mäusen auf einerseits die toxischen Effekte des Oxazolols und andererseits auf die entsprechenden Immunreaktionen zurückzuführen sind.

Eine frühere Studie wies darauf hin, dass der toxische Effekt des Oxazolols den Effekt der Immunreaktion unter Umständen überwiegen könnte, wenn es darum geht, mittels Oxazolol eine Colitis ulcerosa zu induzieren. Somit könnte die Manifestation der Colitis ulcerosa vor allem aufgrund des toxischen Effektes von Oxazolol erfolgen, insbesondere dann, wenn hohe Konzentrationen an Oxazolol den Versuchstieren rektal appliziert werden (58).

Die visuelle Untersuchung des Colons der Versuchstiere zeigte dieselben Veränderungen bei rekonstituierten- wie bei nicht rekonstituierten Mäusen. Die optimale Behandlung scheint nach einer festgelegten Vorsensibilisierung eine rektale Applikation von einer geringen Konzentration an Oxazolol zu sein. Die



vorliegende Arbeit deutet darauf hin. Darüber hinaus scheint einer geringen Menge an Oxazolol die Immunreaktionen und die entsprechend gewünschte Immunantwort in den Versuchstieren zu stimulieren.

Aus den Versuchen der vorliegenden Arbeit kann geschlossen werden, dass der Präsenz von Immunzellen, die bei der Vorsensibilisierung stimuliert wurden, den toxischen Effekt des Oxazolons deutlich abmildern kann. In der vorliegenden Studie konnte dies beobachtet werden. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit scheinen menschliche PBMC einen protektiven Effekt gegen die Toxizität von Oxazolol zu entfalten. Die hohe Variabilität in der Manifestation der klinischen Symptome variierte von fast symptomfrei zu schwersten Ausprägungen, verglichen mit den nicht-rekonstituierten Mäusen. Dies kann den Grad des Rekonstitutions-Erfolges widerspiegeln, das heißt, je höher das Ausmaß der Rekonstitution, desto geringer die Symptomatik einer Oxazolol-Intoxikation.

Für die Immunreaktion bei den rekonstituierten Mäusen ausschlaggebend können einerseits die Präsensibilisierung, und andererseits die Konzentration des Oxazolons ausschlaggebend sein. Es stellt sich die Frage nach der Balance zwischen toxischem Effekt des Oxazolons und der von der Substanz hervorgerufenen Immunreaktion. Dies stellt bis heute eine große Herausforderung dar und weitere Experimente hierzu sind nötig, um die genauen Effekte zu untersuchen.

Die Symptome der Intoxikation mit Oxazolol sind denen der Sepsis ähnlich. Oxazolol hat hierbei vermutlich eine duale Funktion: einerseits könnte es als haptenisierendes Agens fungieren und andererseits könnte es den STAT 6 Signalweg in Gang setzen und fördern. Infolgedessen würden die von STAT 6 vermittelten Zytokine sezerniert. Die ausgeschütteten Zytokine aktivieren und rekrutieren die neutrophilen Zellen, welche die Mucosa des Colons angreifen und zerstören. Somit können pathogene Bakterien leichter in den Darm der betroffenen Tiere eindringen und auch Darmbakterien in andere Körperregionen gelangen. Dieser Prozess kann zu einer vermehrten Ausschüttung von Zytokinen, einem so genannten „cytokine-storm“ führen. Ein solcher führt zu einer kompletten Zerstörung der Darmschleimhaut und zu einem Multiorganversagen. In Gegenwart von PBMC konnte die Entwicklung einer Fibrose beobachtet werden.

Diese könnte einen protektiven Effekt auf die Darmschleimhaut haben. Das fibrotisierte Gewebe könnte die pathogenen Bakterien daran hindern, durch die Darmschleimhaut durchdringen zu können und auch dass die Darmbakterien aus dem Darm heraus und somit andere Körperregionen infizieren können. Die Beobachtung dieses protektiven Effektes könnte auch für die Erforschung menschlicher Erkrankungen hilfreich und von Bedeutung sein. Es scheint bei den rekonstituierten Mäusen eine Balance zu bestehen zwischen toxischem Effekt des Oxazolons und einem protektiven Effekt.

Besonders interessant wird hierbei der Punkt, dass genetische Faktoren, die zu einer Manifestation der Colitis ulcerosa führen, zu Defekten in der Integrität der Schutzbarriere in der Darmschleimhaut führen. Hierbei scheinen die Interleukine eine maßgebliche Rolle zu spielen (65). Es kann darüber spekuliert werden, ob auch im Menschen eine Entzündung eventuell einen protektiven Effekt ausüben könnte. Unter Umständen könnte die Entzündung und die damit verbundene Immunreaktion dazu dienen, weitere Schäden im Körper zu minimieren oder sogar zu verhindern. Im Allgemeinen kommt die vorliegende Studie zur Schlussfolgerung, dass die Lymphozyten in rekonstituierten NOD-SCID IL-2R<sup>null</sup> Mäusen ähnliche Funktionen ausüben wie diejenigen in immunkompetenten Balb/c-Mäusen oder in C57BI/10 Mäusen.

Somit kann das in der vorliegenden Arbeit verwendete Mausmodell ein geeignetes Mittel darstellen, um die Effizienz von Therapeutika, die auf die menschlichen Lymphozyten abzielen, zu untersuchen und zu studieren. Ferner kann das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Modell auch für nicht-menschliche Primaten eine wichtige Basis darstellen, insbesondere dann, wenn Sequenz-Homologien und Cross-Reaktivität von menschlichen Proteinen untersucht werden soll. Das in der vorliegenden Studie vorgestellte Modell kann demnach auch auf andere Tiermodelle ausgeweitet und an diesen angewandt werden. Darüber hinaus kann es auch verwendet werden, um die Reaktionen im menschlichen Körper zu simulieren.

## 6. Zusammenfassung

Colitis ulcerosa ist eine chronische entzündliche Darmerkrankung, die zur Schädigung der Schleimhaut des Colons und des Rektums führt. (1) Ihre Ätiopathogenese ist noch nicht im Detail geklärt. Die Zahl der Colitis ulcerosa Patienten steigt weltweit an, in Deutschland sind rund 168.000 Menschen betroffen. (5,6)

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der Morphologie (Immunhistochemie) in einem innovativen Tiermodell für C. ulcerosa. Wir haben humane Antigene mithilfe von Anti-Human-CD3 sowie Anti – Human-CD45 histologisch in Darmgewebeproben von mit humanen PMBC rekonstituierten NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen nachgewiesen. Weiterhin haben wir humane T-Zellen in der Milz und im Blut der Mäuse nachgewiesen.

Unsere Studie konnte zeigen, dass die mit humanen PBMC-Zellen von Colitis-Patienten bzw. von gesunden Spendern rekonstituierten NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  Mäusen ein geeignetes Tiermodell für in-vivo Studien menschlicher Erkrankungen sind (46). Darauf basierend lassen sich künftig weitere Erkrankungen in vivo erforschen und geeignete Therapien entwickeln.

## 7. Summary

Ulcerative colitis (UC) is a chronic inflammatory bowel disease leading to damage of the mucosa of the colon and rectum. (1) Its etiopathogenesis has not yet been elucidated in detail. The number of ulcerative colitis patients is increasing worldwide, with approximately 168,000 people affected in Germany. (5,6)

The focus of the present work is on morphology (immunohistochemistry) in an innovative animal model for UC. We detected human antigens using anti-human CD3 as well as anti-human CD45 histologically in colonic tissue samples from NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  mice reconstituted with human PMBC. Furthermore, we detected human T cells in the spleen and blood of the mice.

Our study demonstrated that NOD-scid IL2R  $\gamma^{\text{null}}$  mice reconstituted with human PBMC cells from UC patients or from healthy donors are a suitable animal model for in vivo studies of human diseases (46). Based on this, additional diseases can be studied in vivo in the future and appropriate therapies can be developed.

## Literatur

1. Baumgart, D.C., Carding, S.R. (2007). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *The Lancet*. 369 (9573): 1627–1640.
2. Van Limbergen J, Russell RK, Drummond HE, Aldhous MC, Round NK, et al. (2008). Definition of phenotypic characteristics of childhood-onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 135(4):1114-22.
3. Buderus S. (2010). Epidemiologie und klinische Besonderheiten der pädiatrischen CED. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 158(8):745-51.
4. Ruel J, Ruane D, Mehandru S, Gower-Rousseau C, Colombel J-F. (2014). IBD across the age spectrum [mdash] is it the same disease? *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 11(2):88-98.
5. Kucharzik, T., Dignass, A.U., Atreya, R., Bokemeyer, B., Esters, P. et al. (2019). Aktualisierte S3-Leitlinie Colitis ulcerosa. *Z Gastroenterol.* 57: 1321–1405.
6. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G et al (2012) Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 142(1):46–54.e42(quiz e30)
7. Khor B, Gardet A, Xavier RJ (2011) Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474(7351):307
8. Lakatos PL (2006) Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *WJG* 12(38):6102
9. Manninen P, Karvonen AL, Huhtala H, Rasmussen M, Collin P (2010) The epidemiology of inflammatory bowel diseases in Finland. *Scand J Gastroenterol* 45(9):1063–1067
10. Loftus CG, Loftus EV Jr, Harmsen SW, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton JL III, Sandborn WJ (2006) Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940–2000. *Inflamm Bowel Dis* 13(3):254–261.
11. Rösch W. Teil-E Gastroenterologie, Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Duale Reihe Innere Medizin (2009). Thieme Verlag, Stuttgart.

12. Herold, G. (2018). *Innere Medizin*. Thieme-Verlag, Stuttgart.
13. Oliva-Hemker M, Fiocchi C. (2002). Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease: the importance of the pediatric perspective. *Inflammatory bowel diseases*. 8(2):112-28.
14. Schulenburg H, Kurz CL, Ewbank JJ. (2004). Evolution of the innate immune system: the worm perspective. *Immunol Rev*. 198:36–58.
15. Maloy KJ, Powrie F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*. 474:298–306
16. Cader MZ, Kaser A. (2013) Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut*. 62:1653–1664
17. Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, et al. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*.131:117–129. 15.
18. Jass JR, Walsh MD. (2001). Altered mucin expression in the gastrointestinal tract: a review. *J Cell Mol Med*. 5:327–351
19. Sartor RB. (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*.3:390–407.
20. Abraham C, Cho JH. (2009). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 361:2066–2078.
21. Abraham C, Cho JH. (2009). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 361:2066–2078.
22. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307:1915–1920.
23. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, et al. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308:1635–1638.
24. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:13780–13785.

25. Khan KJ, Ullman TA, Ford AC, Abreu MT, Abadir A, et al. (2011). Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 106:661–673.
26. Mitsuyama K, Niwa M, Takedatsu H, Yamasaki H, Kuwaki K, et al. (2016) Antibody markers in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 22:1304–1310.
27. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 411:599–603.
28. Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. (2005). Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev.* 206:260–276.
29. Mudtler, J., Neurath, M.F. (2003). Die Rolle von Zytokinen in der Pathogenese und Therapie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 46, 217–224
30. de Souza, H.S. Fiocchi, C. (2016). Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 13(1): 13–27.
31. Korzenik, J.R., Podolsky, D.K. (2006). Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Drug Discovery* 5(3):197-209.
32. Maul. J., Zeitz, M. (2012). Colitis Ulzerosa: Immundefektion, Gewebefibrose und aktuelle Therapieansätze. *coloproctology* 34, 401–409.
33. Russell RK, Satsangi J. (2008). Does IBD run in families? *Inflammatory bowel diseases.* 14:S20-S1.
34. Henderson P, van Limbergen JE, Wilson DC, Satsangi J, Russell RK. (2011) Genetics of childhood-onset inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases.*7(1):346-61.
35. Russell R, Satsangi J. (2004). IBD: a family affair. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 18(3):525-39.

36. Ruel J, Ruane D, Mehandru S, Gower-Rousseau C, Colombel J-F. (2014). IBD across the age spectrum [mdash] is it the same disease? *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 11(2):88-98.
37. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J. (2007). The genetics of inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology* 102(12):2820.
38. Rodeck B, Zimmer K-P. (2013). *Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung*. Springer, Berlin, Heidelberg.
39. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T et al. (2005). Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 19: 5–36.
40. Mahid SS, Minor KS, Soto RE et al. (2006). Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 81: 1462–1471.
41. Hoie O, Wolters F, Riis L et al. (2007). Ulcerative colitis: patient characteristics may predict 10-yr disease recurrence in a European-wide populationbased cohort. *Am J Gastroenterol* 102: 1692–1701.
42. Beaugerie L, Massot N, Carbonnel F et al. (2001). Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 96: 2113–2116.
43. Ho GT, Chiam P, Drummond H et al. (2006). The efficacy of corticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: analysis of a 5-year UK inception cohort. *Aliment Pharmacol Ther* 24: 319–330.
44. Faubion WA Jr, Loftus EV Jr, Harmsen WS et al. (2001). The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a populationbased study. *Gastroenterology* 2001; 121: 255–260.
45. Toruner M, Loftus EV Jr, Harmsen WS et al. (2008). Risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 134: 929–936.
46. Nolte, T., Zadeh-Khorasani, M., Safarov, O. et al. (2013). Oxazolone and ethanol induce colitis in non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency



- interleukin-2R $\gamma^{\text{null}}$  mice engrafted with human peripheral blood mononuclear cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 172: 349–362
47. Bosma, G. C., Custer, R. P. & Bosma, M. J. (1988). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*301, 527–530.
48. Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Baird, S. M. & Wilson, D. B. (1988). Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature*335, 256–259.
49. McCune, J. M. et al. (1988) The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science*241, 1632–1639.
50. Lapidot, T. et al. (1992). Cytokine stimulation of multi-lineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science*255, 1137–1141.
51. Shultz, L. D. et al. (1995). Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol.*154, 180–191.
52. Ishikawa, F. et al. (2005). Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor  $\gamma$ -chainnull mice. *Blood*106, 1565–1573.
53. Cao, X. et al. (1995). Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor  $\gamma$ -chain. *Immunity*2, 223–238.
54. DiSanto, J. P., Muller, W., Guy-Grand, D. et al. (1995). Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor  $\gamma$ -chain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*92, 377–381.
55. Ohbo, K. et al. (1996). Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor  $\gamma$ -chain. *Blood*87, 956–967.
56. Köhler, M. (1986). The BALB/c Mouse - Genetics and Immunology. *Journal of Basic Microbiology* 26(7):388.
57. Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity*. 2002;17:629–638.
58. Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazolone colitis: a murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 1998; 188:1929–39.

59. Kojima R, Kuroda S, Ohkishi T, Nakamaru K, Hatakeyama S. Oxazolone-induced colitis in BALB/C mice: a new method to evaluate the efficacy of therapeutic agents for ulcerative colitis. *J Pharmacol Sci* 2004; 96:307–13.
60. Fowler DH, Kurasawa K, Smith R, Eckhaus MA, Gress RE. Donor CD4-enriched cells of Th2 cytokine phenotype regulate graft-versus-host disease without impairing allogeneic engraftment in sublethally irradiated mice. *Blood* 1994; 84:3540–9.
61. Pan L, Delmonte J, Jr, Jalonen CK, Ferrara JL. Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood* 1995; 86:4422–9.
62. Krenger W, Snyder KM, Byon JC, Falzarano G, Ferrara JL. Polarized type 2 alloreactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> donor T cells fail to induce experimental acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 1995; 155:585–93.
63. Jowett SL, Seal CJ, Pearce MS et al. Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Gut* 2004; 53:1479–84.
64. KING M., PEARSON T., SHULTZ L.D. et al. (2008) A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene. *Clin Immunol* 126(3):303–14.
65. Franke A, Balschun T, Sina C et al. Genome-wide association study for ulcerative colitis identifies risk loci at 7q22 and 22q13 (IL17REL). *Nat Genet* 2010; 42:292–4.
- 66: Deutsche Morbus Crohn/Colitis ulcerosa Vereinigung (o.J.) <https://www.dccv.de/betroffene-angehoerige/medizinische-grundlagen/was-ist-colitis-ulcerosa/> (abgerufen am 20.05.2021).

Wiesbaden, 05.04.2022.

Safarov Orkhan



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Promotionsbüro  
Medizinische Fakultät



### Eidesstattliche Versicherung

# Safarov, Orkhan

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

## Mäuse mit humanisiertem Immunsystem als Model für Colitis Ulcerosa

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient

und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind,

als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle

einzelnen nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Wiesbaden, 05.04.2022

Safarov, Orkhan

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand