Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Der Interleukin-1β-converting-enzyme-Inhibitor Pralnacasan reduziert die Dextran-Sulfat-Sodium-induzierte Kolitis und die IL-18-vermittelte Th1-Zell-Aktivierung

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

Vorgelegt von
Christian Bauer
aus München
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter	Prof. Dr. med. S. Endres
Zweiter Berichterstatter	Prof. Dr. med. B. Göke
Dritter Berichterstatter	Priv. Doz. Dr. med. Th. Lang
Vierter Berichterstatter	Priv. Doz. Dr. med. H. Engelmann
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter	PD Dr. med. A. Eigler Dr. med. F. Loher
Dekan	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung	04.05.2006

Meinen Eltern in Dankbarkeit

1. Einleitung 7
1.1 Zytokine in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen 7
1.2 Das Interleukin-1β-converting-enzyme ICE 9
1.3 Mechanismen von ICE im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen 10
1.4 Der ICE-Inhibitor Pralnacasan 11
1.5 Das Modell der akuten Dextran-Sulfat-Sodium-induzierten murinen Kolitis ... 13
1.6 Zielsetzung 16
2. Material und Methoden 17
2.1 Substanzen 17
2.1.1 Pralnacasan 17
2.1.2 Rolipram 17
2.1.3 Dextran-Sulfat-Sodium 17
2.1.4 TNBS 17
2.2 Versuchstiere 18
2.2.1 Tierversuchsantrag 18
2.2.2 Tierbeschaffung 18
2.2.3 Tierhaltung 18
2.2.4 Anästhesie der Mäuse und Beendigung der Versuche 18
2.2.5 Darmpräparation und Gewinnung von Gewebematerial 18
2.3 Kolitisaktivität 19
2.3.1 Klinischer Score 19
2.3.2 Histologischer Score 20
2.4 Praktische Durchführung des Kolitis-Modells 21
2.4.1 Prophylaktisches Modell der DSS-induzierten Kolitis 21
2.4.2 Therapeutisches Modell der DSS-induzierten Kolitis 21
2.4.3 Modell der TNBS-induzierten Kolitis 21
2.4.4 Durchführung der Medikamentenapplikation 22
2.5 Zellkultur, Durchflusszytometrie und Zytokinbestimmung 22
2.5.1 Kulturmedium und Inkubation 22
2.5.2 Lymphozytenzellkultur 22
2.5.3 Durchflusszytometrie 22
2.5.4 Splenozytenkultur und Zytokinbestimmung 23
2.5.5 Zytokinbestimmung in Kolongewebe 23
2.6 RNA-Extraktion und reverse Transkription 23
2.7 Konventionelle PCR 24

2.8 *Real-time*-PCR 26
2.9 Statistische Methoden 27
3. Ergebnisse 28
3.1 Der Interleukin-1β-converting-enzyme-Inhibitor Pralnacasan lindert die DSS-induzierte Kolitis 28
3.1.1 Klinischer Verlauf der DSS-induzierten Kolitis unter Pralnacasan 28
3.1.2 Darmlänge und histologischer Score 30
3.1.3 Synthese proinflammatorischer Proteine in Kolongewebe 31
3.1.4 Produktion von Interferon-γ in paraaortalen Lymphknoten 32
3.1.5 *In vitro*-Synthese von Interferon-γ durch Splenozyten 33
3.1.6 Pralnacasan im therapeutischen Modell 34
3.2 Pralnacasan bewirkt die Reduktion einer IL-18-vermittelten Th1-Immunantwort im Modell der DSS-induzierten Kolitis 35
3.2.1 Die Linderung der DSS-induzierten Kolitis durch Pralnacasan ist mit reduzierten IL-18-Spiegeln verbunden 35
3.2.2 Pralnacasan reduziert signifikant den Anstieg der IP-10-mRNA-Expression ... 39
3.2.3 Pralnacasan besitzt hohe therapeutische Wirksamkeit in C57BL/6 Mäusen und verhindert den IFN-γ-Anstieg unter DSS-Gabe 41
3.2.4 Der Anstieg der IP-10-mRNA-, nicht aber der TNF-α-mRNA-Expression unter DSS-Gabe wird in C57BL/6 Mäusen durch Pralnacasan unterbunden 43
3.2.5 Schädigung des Epithels durch DSS-Gabe 45
3.3 Untersuchung alternativer Parameter der Kolitisaktivität in der Spätphase der DSS-induzierten Kolitis 48
3.3.1 TNF-α-, MCP-1- und KC-mRNA-Expression 48
3.3.2 IL-18-, IP-10- und TNF-α-mRNA-Expression in paraaortalen Lymphknoten 51
3.3.3 IFN-γ-positive Lymphozyten aus paraaortalen Lymphknoten 52
3.4 Additiver Effekt von Pralnacasan mit TNF-α-reduzierenden Substanzen und Wirksamkeit in direkt T-Zell-vermittelten CED-Modellen 55
3.4.1 Pralnacasan in Kombination mit dem PDE IV-Inhibitor Rolipram 55
3.4.2 Pralnacasan im Modell der TNBS-induzierten Kolitis 59
3.5 MCP-1 wirkt protektiv im Modell der DSS-induzierten Kolitis 60
3.5.1 Klinischer Verlauf 60
3.5.2 Histologische Analyse 61
3.5.3 Zytokinproduktion 63
3.5.4 IP-10-mRNA-Expression 64
3.5.5 Gewichtsverlust und Darmlänge 64
4. Diskussion 65

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse 65
4.1.1 Der Interleukin-1β-converting-enzyme-Inhibitor Pralnacasan lindert die DSS-induzierte Kolitis 65
4.1.2 Pralnacasan bewirkt die Reduktion einer IL-18-vermittelten Th1-Immunantwort im Modell der DSS-induzierten Kolitis 65
4.1.3 Untersuchung alternativer Parameter der Kolitisaktivität in der Spätphase der DSS-induzierten Kolitis 66
4.1.4 Additiver Effekt von Pralnacasan mit TNF-α-reduzierenden Substanzen und Wirksamkeit in direkt T-Zell-vermittelten CED-Modellen 66
4.1.5 MCP-1 besitzt einen protektiven Effekt im Modell der DSS-induzierten Kolitis 66
4.2 Diskussion der Ergebnisse vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur 67
4.2.1 Der ICE-Inhibitor Pralnacasan lindert die DSS-induzierte Kolitis 67
4.2.2. Pralnacasan bewirkt die Reduktion einer IL-18-vermittelten Th1-Immunantwort im Modell der DSS-induzierten Kolitis 69
4.2.3 Untersuchung alternativer Parameter der Kolitisaktivität in der Spätphase der DSS-induzierten Kolitis 75
4.2.4 Additiver Effekt von Pralnacasan mit TNF-α-reduzierenden Substanzen und Wirksamkeit in direkt T-Zell-vermittelten CED-Modellen 77
4.2.5 MCP-1 besitzt protektiven Effekt im Modell der DSS-induzierten Kolitis 78
4.3 Klinische Relevanz 79
5. Zusammenfassung und Schlussbetrachtung 81
6. Literaturverzeichnis 83
7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme 90
Danksagung 91
Publikationen 92
Curriculum vitae 94

1. Einleitung

1.1 Zytokine in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind entzündliche Darmerkrankungen mit chronischem Verlauf; die Ätiologie dieser Krankheiten ist unbekannt. Bei Morbus Crohn handelt es sich um eine transmurale, granulomatöse Entzündung, die den gesamten Magen-Darmtrakt erfassen kann, meist jedoch den Bereich des terminalen Ileum betrifft. Das Infiltrat an Entzündungszellen besteht hauptsächlich aus T- und B-Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen. Demgegenüber ist die Colitis ulcerosa auf den Dickdarm begrenzt und betrifft hauptsächlich die oberflächlichen Schichten der Darmwand. Es finden sich Kryptenabszesse, bestehend aus Ansammlungen neutrophiler Leukozyten. Letztendlich kommt es zur Nekrose des Epithels, zu Ödemen und hämorrhagischen Episoden. Beiden Krankheiten liegen sowohl genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse zugrunde [Sartor 1995; Fiocchi 1998]. Scheinbar ist für die Induktion chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) ein initialer Antigenstimulus entscheidend. Eine Reihe von Arbeiten deutet auf die normale Darmflora als notwendiger Faktor in diesem Prozess hin [Sadlack 1993]. Duchmann et al. haben gezeigt, dass bei CED-Patienten lediglich mukosale Makrophagen aus betroffenen Abschnitten, nicht aber aus gesunden Bereichen proliferieren, wenn sie autologen Darmbakterien ausgesetzt werden [Duchmann 1995]. Die Gruppe vermutete, dass es Infektionen sind, die in empfänglichen Individuen die T-Zell-Toleranz der normalen Darmmukosa durchbrechen.

Auch das Epithel der Darmwand ist an der Induktion einer mukosalen Immunantwort prominent beteiligt [Panes 2001]. Bei CED ist die mukosale Permeabilität erhöht [Wyatt 1997], außerdem schütten Epithelzellen Zytokine und Chemokine aus [Kagnoff 1997]. Zudem dienen Enterozyten als Antigen-präsentierende Zellen (APC). Letztlich resultiert so die Aktivierung von CD4-T-Zellen mit anschließender Proliferation und Entwicklung zu Th1- oder Th2-Zellen. Es wurde postuliert und gilt inzwischen als gesichert, dass gerade Morbus Crohn ein distinktes Th1-Zytokinmuster aufweist [Parronchi 1997; Plevy 1997]. Darüber hinaus spielen Makrophagen eine bestimmende Rolle. Zum einen dienen auch sie als Antigen-präsentierende Zellen, zum anderen sind sie wichtige Produzenten proinflammatorischer Zytokine. Pizarro et al. haben nachgewiesen, dass aktivierte Makrophagen IL-12 und IL-18 sezernieren und dadurch die Differenzierung zu Th1-Zellen bei Morbus Crohn fördern [Monteleone 1999; Pizarro 1999].

Unbestritten ist die Mediatorrolle von Zytokinen in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Experimentelle Tiermodelle haben sich dabei als Instrument zur Erforschung der immunologischen Vorgänge bewährt [Panes 2001]. Eine Fülle von Arbeiten beschäftigte sich seit Anfang der neunziger Jahre mit der überragenden Rolle von Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α) [Cappello 1992; Murch 1993]. Vereinfachend wird die Wirkungsweise des Zytokins TNF-α mit dem Begriff „proinflammatorisch" umschrieben. TNF-α kann die Aktivierung von Makrophagen auf autokrine Weise steigern. Außerdem wirkt es als kostimulatorisches Signal und kann so T-Zell Antworten fördern [Fiocchi 1998]. Des weiteren induziert TNF-α die Expression von Adhäsionsmolekülen im vaskulären Endothel [Salas 2000]. In den vergangenen Jahren wurden diverse Strategien erprobt, die destruktive Wirkung dieses Zytokins zu unterbinden [van Dullemen 1995]. Die Anwendung des Anti-TNF-α-Antikörpers Infliximab im Rahmen der CED ist das Ergebnis dieser Grundlagenforschung. Die wiederholte Gabe des Anti-TNF-α-Antikörpers führt jedoch zur Bildung von gegen Infliximab gerichteten Antikörpern [Sandborn 1996]. Zudem besitzt TNF-α anscheinend ein breiteres Wirkungsspektrum als bisher angenommen und wird innerhalb des Immunsystems benötigt, um humorale Immunität zu unterbinden. Via et al. postulierten, dass TNF-α für die Induktion zytotoxischer T-Zell-Antworten, durch die autoreaktive B-Zellen eliminiert werden, benötigt wird [Via 2001]. Neue Arbeiten beschäftigen sich mit der Rolle von Infliximab für das Apoptosegeschehen im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen [Ten Hove 2002].

Auch aufgrund dieser Schwierigkeiten sind inzwischen weitere Zytokine auf ihre physiologische Relevanz und ihr therapeutisches Potential hin untersucht worden. Bereits 1989 konnte nachgewiesen werden, dass mononukleäre Zellen aus Kolonbiopsien von Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn mehr IL-1β produzieren als Zellen aus normaler Mukosa [Mahida 1989; Mahida 2000]. Die Wirkung von IL-1β hängt nicht allein von dem Zytokin selbst ab, sondern auch von der Menge an natürlich vorhandenem IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1Ra). Scheinbar kommt dem Gleichgewicht zwischen IL-1β und IL-1Ra pathogenetische Bedeutung in Entzündungsvorgängen zu: IL-1Ra-defiziente Mäuse entwickeln eine spontane rheumatoide Arthritis [Horai 2000]. In mehreren Kolitismodellen zeigte die Gabe von IL-1Ra therapeutische Wirksamkeit [Cominelli 1996].

Mehrere tierexperimentelle Studien bieten Hinweise, dass IL-18 eine wichtige Rolle in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zukommt. Nakamura et al. bestätigten 2000 den synergistischen Effekt von IL-18 und IL-12 durch kombinierte oder einzelne Gabe an Versuchstiere auch *in vivo* [Nakamura 2000]. Die gemeinsame Verabreichung von IL-12 und IL-18 führte zu einer ausgeprägten Immunantwort, welche die

Autoren an einen Endotoxin-induzierten septischen Schock erinnerte und an der die Versuchstiere auch verstarben. Ein charakteristisches Symptom der toxischen Reaktion war eine ausgeprägte hämorrhagische Kolitis. IL-12 allein führte lediglich zu milden Symptomen, IL-18 allein zu gar keinen. Interessanterweise fanden die Autoren erhöhte IFN-γ-Spiegel, aber kein erhöhtes TNF-α. Chikano et al. bestätigten die Befunde und schlugen einen IFN-γ-abhängigen Mechanismus der Kolitis in ihrem Modell vor [Chikano 2000].

Vor allem IL-18 hat in den vergangenen Jahren Beachtung als Angriffspunkt experimenteller Therapeutika gefunden. Der Einsatz von anti-IL-18-Strategien war in Tiermodellen wirksam [Ten Hove 2001; Siegmund 2001 a]. Doch die Gabe von Antikörpern gegen IL-18 und andere Zytokine dürfte ähnliche Komplikationen wie der Einsatz von Infliximab nach sich ziehen. Alternative antiinflammatorische Strategien versuchen daher, bereits die Bildung oder die biologische Aktivierung proinflammatorischer Zytokine zu unterbinden. Dadurch könnte auf den Einsatz monoklonaler Antikörper, die neben den Nebenwirkungen oft auch nur kurzfristigen therapeutischen Effekt bieten, zur Suppression dieser Zytokine verzichtet werden. Im Fall von IL-18 und IL-1β existiert ein Mechanismus, mit dessen Hilfe dieses theoretische Konzept zu verwirklichen sein könnte. Das Interleukin-1β-converting-enzyme (ICE), das die biologische Aktivierung von IL-18 und IL-1β auf molekularer Ebene vermittelt, ist ein besonders erfolgversprechender Kandidat zur Verwirklichung dieser Strategie [Fantuzzi 1999]. Die experimentelle Überprüfung dieser Hypothese ist das Hauptziel der vorliegenden Arbeit.

1.2 Das Interleukin-1β-converting-enzyme ICE

Seit 1993 ist bekannt, dass das Interleukin-1β-converting-enzyme zu einer größeren Familie strukturell und funktionell homologer intrazellulärer Cysteinproteasen gehört [Yuan 2001]. ICE ist ein Synonym für Caspase-1 und Namensgeber für eine große Unterklasse der Caspasen, die ICE-like sub-family. Das ICE-Gen codiert für ein inaktives Vorläuferprotein von 45 kDA und wird in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert [Siegmund 2002]. Während die meisten Caspasen an der Regulation von Apoptosevorgängen mitwirken, scheint ICE an diesem Prozess weniger beteiligt zu sein. Die Hauptfunktion von Caspase-1 liegt vielmehr in der Prozessierung und damit biologischen Aktivierung von IL-1β und IL-18 [Fantuzzi 1999]. Nach der Spaltung der Proformen werden die beiden intrazellulär aktivierten Zytokine durch einen bisher unbekannten Mechanismus sezerniert. ICE wirkt damit an der Regulation einer Vielzahl von Zytokinkaskaden mit.

Das Enzym ICE selbst unterliegt einer ganzen Reihe spezifischer Regulationsmechanismen. CD40-Ligand ist in der Lage Caspase-1 zu aktivieren und die Sekretion von IL-1β anzuregen [Schonbeck 1997]. McAlidon et al. haben berichtet, dass IFN-γ die Expression, nicht aber die Aktivierung von ICE in Makrophagen fördern kann [McAlindon 1998]. Die Gruppe konnte zeigen, dass Makrophagen normaler Darmmukosa nach Stimulation durch LPS lediglich das precursor-Protein von IL-1β produzierten, da diese Zellen kein aktives ICE besaßen. Makrophagen aus der Darmmukosa von Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung jedoch sezernierten biologisch aktives IL-1β, da ihr Interleukin-1β-converting-enzyme aktiviert war. Die Aktivität von ICE wird durch intrazelluläre Inhibitoren reguliert. Young et al. zeigten, dass der Serinproteinase-Inhibitor-9 die Aktivität des Interleukin-1β-converting-enzyme in Zellen glatter Muskulatur reduziert [Young 2000]. Die Bedeutung von ICE im Rahmen entzündlicher Geschehen zeigt sich deutlich in verschiedenen ICE-Knockout-Experimenten der letzten Jahre. ICE-defiziente Mäuse waren resistent gegen ansonsten tödlich verlaufende *E. coli*- und *S. typhimurium*-Endotoxämie [Netea 2000]. Kürzlich demonstrierte eine Arbeit von Siegmund et al. die Bedeutung des Enzyms ICE im Rahmen der Dextran-Sulfat-Sodium (DSS)-induzierten Colitis: ICE-defiziente Mäuse waren fast vollständig vor den Auswirkungen einer vierwöchigen DSS-Gabe geschützt [Siegmund 2001 d]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Inhibierung von ICE gegen die Induktion einer experimentellen Pankreatitis schützt [Paszkowski 2002].

1.3 Mechanismen von ICE im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Pro-IL-18 und Pro-IL-1β sind die Zielproteine des Interleukin-1β-converting-enzymes. Beide Proformen besitzen eine Peptidstruktur, die eine sofortige Sezernierung verhindert [Gu 1997]. Daher verbleiben die Proformen im Zytosol bis die Prozessierung durch ICE diejenigen Sekretionsmechanismen in Gang setzt, die die biologisch aktiven Zytokine aus der Zelle heraus transportieren. Caspase-1 nimmt damit eine zentrale Rolle in der Regulation der beiden Zytokine IL-1β und IL-18 ein.

Interleukin-1β wird von aktivierten Monozyten und Makrophagen produziert. Vor allem mikrobielle Stimuli induzieren die Produktion von IL-1β, doch auch eine Reihe nichtmikrobieller Stimuli steigern die Synthese dieses Zytokins. Komplementfaktor-5, Hypoxie und das Anhaften an Oberflächen induziert in Monozyten die Expression großer Mengen an IL-1β-mRNA. Doch erst ein zweiter Stimulus, beispielsweise IL-1β-Protein selbst, aktiviert die Translationsmechanismen der Zellen [Stevenson 1992]. Biologisch aktives IL-1β

seinerseits stimuliert B- und T-Lymphozyten ebenso wie Knochenmarkszellen, aktiviert die Akute-Phase-Reaktion und wirkt als endogenes Pyrogen [Dinarello 1996].

Interleukin-18 ist strukturell verwandt mit IL-1β; bei beiden handelt es sich um Proteine in β-Faltblattstruktur. Anders als IL-1β werden IL-18-mRNA und Precursor-Protein jedoch konstitutiv exprimiert [Akita 1997]. Monozyten und Makrophagen sind die am besten untersuchte Quelle von IL-18 [Dinarello 1999], jedoch auch in murinen Splenozyten, Keratinozyten [Stoll 1997] und Kupfferzellen der Leber [Okamura 1995] wurde die Expression von IL-18 nachgewiesen. Die Produktion von biologisch aktivem IL-18 wird beispielsweise von bakteriellem Lipopolysaccharid oder Zytokinen wie TNF-α und IL-1β induziert. IL-18 wiederum induziert vorrangig die Produktion von IFN-γ in T-Zellen und NK-Zellen [Dinarello 1999]. Gerade die Potenz von IL-18 zur Induktion der IFN-γ-Synthese führte zu dessen Entdeckung als IFN-γ-inducing-factor (IGIF) [Okamura 1995].

Die Induktion erfolgt nicht direkt, sondern lediglich in Kostimulation mit IL-12 [Ushio 1996]. Dieses proinflammatorische Zytokin seinerseits stammt ebenso wie IL-18 vorrangig aus Monozyten und Makrophagen und entfaltet seine mit IL-18 synergistische Wirkung durch Induktion des IL-18-Rezeptors in den Zielzellen [Barbulescu 1998]. Aus *in vitro* Versuchen ist das Potential des von T- und NK-Zellen gebildeten IFN-γ bekannt. Zum einen kann IFN-γ direkt auf die Makrophagen zurückwirken und hier beispielsweise die zusätzliche Bildung von ICE bewirken, was zu einer Potenzierung der IL-18 Aktivität führt. IFN-γ bewirkt aber auch, dass sich T-Zellen in Richtung einer Th1-Immunantwort entwickeln. Dadurch kommt es zur vermehrten Freisetzung von TNF-α, FasLigand und Lymphokinen durch die T-Zellen, was wiederum zur gesteigerten Produktion und Sekretion von TNF-α, FasLigand, IL-8 und IL-1β in Monozyten und Makrophagen führt. In den vergangenen Jahren haben sich diese Ergebnisse *in vivo* bestätigen lassen und es gilt als gesichert, dass Interleukin-18 eine zentrale Mediatorenfunktion in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen einnimmt [Dinarello 1999].

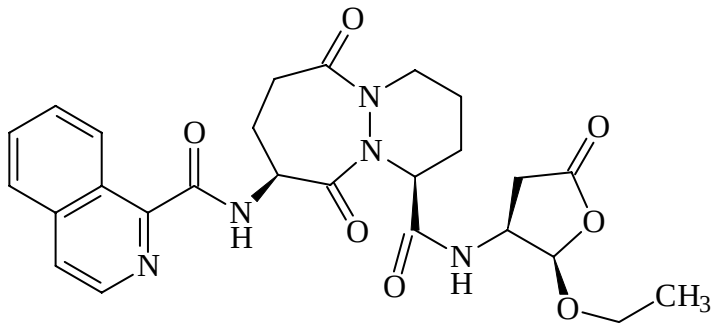
1.4 Der ICE-Inhibitor Pralnacasan

Bereits kurz nach der Entdeckung des Enzyms ICE wurde das therapeutische Potential einer Inhibierung erkannt. So berichteten Norman et al. bereits 1997 über den protektiven Effekt eines ICE-Inhibitors in einem experimentellen Modell der akuten Pankreatitis [Norman 1997]. Eine Reihe von Firmen hat in den letzten Jahren intensive Anstrengungen unternommen oral bioverfügbare ICE-Inhibitoren mit einem akzeptablen Nebenwirkungsspektrum zu entwickeln

und patentieren zu lassen [Ashwell 2001; Leung-Toung 2002]. Die Firma Vertex hatte 1994 über die Identifizierung der dreidimensionalen Struktur des Interleukin-1β-converting-enzymes berichtet und entwickelte, auf diesen Ergebnissen aufbauend, in den Folgejahren Inhibitoren des Enzyms [Wilson 1994]. 1997 ging die Substanz Pralnacasan (auch VX-740, HMR 3480; Patent US 6204261, 2001) aus diesem Programm hervor. Pralnacasan war als Prodrug mit Ethyl-Hemiacetal-Struktur konstruiert worden (**Abb. 1**) und besaß eine gute orale Bioverfügbarkeit von 43%. Es zeigte sich, dass die Proform nach Absorption rasch zum aktiven Aldehyd-Protease-Inhibitor hydrolysiert wurde. Ku et al. sowie Rudolphi et al. berichteten in den letzten Jahren über die therapeutische Wirksamkeit von Pralnacasan in verschiedenen murinen Modellen rheumatoider Arthritis [Ku 2001; Rudolphi 2003].

Pralnacasan war die erste Substanz aus der Wirkstoffklasse der ICE-Inhibitoren, die in klinische Studien Eingang fand. In einer Phase I-Studie wurde Pralnacasan gesunden Freiwilligen verabreicht. Das Nebenwirkungsprofil war erfolgversprechend; die Probanden erreichten nach oraler Applikation Pralnacasan-Plasmaspiegel, die ausreichten in einem *ex vivo* Assay die Produktion von IL-1β zu inhibieren [Siegmund 2002]. Phase II-Studien bestätigten die positiven Befunde. In die randomisierte, doppelverblindete und placebokontrollierte Studie wurden 285 Patienten mit leichter bis moderater rheumatoider Arthritis aus 31 Zentren in sieben europäischen Ländern eingeschlossen. Endpunkte der zwölfwöchigen Studie waren zwanzigprozentige Verbesserungen der Standardparameter. 44% der Patienten, die mit 1200 mg Pralnacasan täglich behandelt wurden, sprachen auf die Behandlung an; nur 32,7% der Patienten der Placebogruppe erfüllten die Wirksamkeitskriterien [Vertex Pharmaceuticals Inc. 2002]. Im April 2002 beschloss Vertex, Pralnacasan in weiterführende klinische Studienprotokolle aufzunehmen. Die Entscheidung wurde auch mitgetragen von der Beobachtung, dass Pralnacasan anscheinend keine toxischen Nebenwirkungen besaß. Bisher sind keine Daten dieser weiterführenden Studien bekannt.

Die Substanz Pralnacasan wurde freundlicherweise durch die Firma Aventis, die den ICE-Inhibitor Pralnacasan in Kooperation mit Vertex entwickelt, zur Verfügung gestellt. Nachdem die klinischen Daten bezüglich der Primärindikation der rheumatoiden Arthritis erfolgversprechend waren, sollte in einem murinen Modell der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen überprüft werden, ob Pralnacasan auch für diese Indikation erfolgversprechende Ergebnisse zeigen würde. Die Überprüfung der therapeutischen Wirksamkeit sowie die nähere Charakterisierung der molekularbiologischen und immunologischen Wirkung von Pralnacasan im Modell der akuten DSS-induzierten murinen Kolitis ist das Hauptziel der vorliegenden Arbeit.



Formel	$C_{26}H_{29}N_5O_7$
Molekulargewicht	523,55 Da

Abbildung 1: Strukturformel des Interleukin-1β-converting-enzyme-Inhibitors Pralnacasan.

1.5 Das Modell der akuten Dextran-Sulfat-Sodium-induzierten murinen Kolitis

Die DSS-induzierte Kolitis gilt als zuverlässiges Modell entzündlicher Darmerkrankungen [Okayasu 1990; Cooper 1993]. Es ist kostengünstig und sicher reproduzierbar. Die Mäuse nehmen das Dextran-Sulfat-Sodium mit dem Trinkwasser auf und zeigen nach vier bis fünf Tagen erste kolitische Symptome. Nach elf Tagen haben die Tiere eine schwere Kolitis mit Durchfall, blutigem Stuhl und 30-40-prozentigem Gewichtsverlust entwickelt [Siegmund 2001 b]. Histologisch ist die akute DSS-Kolitis durch die Infiltration von Makrophagen, Neutrophilen und Eosinophilen gekennzeichnet [Stevceva 2001]. Es resultieren Kryptenabszesse und eine ausgedehnte Schädigung des Epithels [Venkatraman 2000]. DSS hat prokarzinogenes Potenzial und findet im Rahmen von murinen Karzinogenesemodellen Verwendung [Suzuki 2004].

Verschiedene pathophysiologische Mechanismen wurden vorgeschlagen, um die Wirkung von DSS zu erklären. Zum einen hat DSS einen direkten epitheltoxischen Effekt. Von einigen Forschergruppen wird das DSS-Modell daher als Epithelschadensmodell zur Untersuchung intestinaler Wundheilungsvorgänge betrachtet [Dieleman 1996; Egger 1999; Williams 2001]. Die Zerstörung der mukosalen Barriere führt allerdings auch dazu, dass Bakterien in das Darmgewebe eindringen und hier Lamina propria-Zellen aktivieren können. Die Invasion von Bakterien der normalen Darmflora ist ein wichtiger pathophysiologischer Mechanismus chronisch entzündlicher Darmerkrankungen [Hernandez 2003]; gerade unter diesem Gesichtspunkt gewinnt die DSS-induzierte Kolitis als Modell chronisch entzündlicher Darmerkrankungen an Attraktivität [Kitajima 1999]. Dabei scheint die Gabe von DSS die

Zusammensetzung der physiologischen Darmflora zu beeinflussen [Hans 2000; Rumi 2004]. Darüber hinaus kommt es zur Phagozytose des DSS durch intestinale Makrophagen, die somit auch direkt aktiviert werden und Zytokine sezernieren [Araki 2000]. Kitajima et al. fanden, dass sich DSS einen Tag nach Beginn der Gabe nicht nur im Dickdarm, sondern auch in mesenterialen Lymphknoten und in Kupfferzellen der Leber nachweisen lässt [Kitajima 1999]. *In vitro* wurde nachgewiesen, dass die Aktivierung mukosaler Makrophagen durch DSS möglich ist [Sasaki 1996].

Von verschiedenen Gruppen wurde vorgeschlagen, dass die pathophysiologischen Vorgänge bei der akuten DSS-induzierten Kolitis scharf von denen der sogenannten chronischen DSS-induzierten Kolitis zu trennen sei [Hans 2000]. Bei diesem Modell wird die DSS-Gabe periodisch unterbrochen; nach vier bis fünf DSS-Zyklen werden die Mäuse auch in den DSS-freien Intervallen nicht mehr vollständig gesund und es wurde postuliert, dass diese Entzündung nun spezifische pathophysiologische Eigenschaften chronisch entzündlicher Darmerkrankungen aufweise. Ist die akute DSS-induzierte Kolitis demnach also vor allem durch Mechanismen des angeborenen Immunsystems gesteuert und von der Invasion von Bakterien, der Zerstörung des Epithels und der Aktivierung von Neutrophilen und Makrophagen abhängig, so ist die chronische DSS-Kolitis nach diesem Konzept ein T-Zell-gesteuerter Vorgang. Obermeier et al. berichteten, dass IFN-γ eine wichtige Rolle in der Pathogenese der chronischen DSS-induzierten Kolitis spielt [Obermeier 1999]. Dielemann et al. fanden in der chronischen DSS-induzierten Kolitis ein typisches Th1/Th2-Zytokinprofil [Dieleman 1998]. Dieselbe Gruppe beschrieb allerdings auch, dass die Induktion der DSS-Kolitis in immundefizienten SCID-Mäusen gelingt, die über keine funktionsfähigen T-Zellen verfügen [Dieleman 1994; Axelsson 1996].

In Experimenten mit ICE-Knockout-Mäusen bestätigte die Gruppe von Dinarello die Bedeutung von IL-18 für die akute DSS-induzierte Kolitis. Demgegenüber scheint IL-1β keine hervorgehobene Rolle in der Pathogenese zu besitzen [Siegmund 2001 d]. 1998 postulierten Shintani et al., dass CD4-Helferzellen, die durch Makrophagen aktiviert werden, die entscheidende Rolle in der DSS-Kolitis spielen [Shintani 1998]. **Abb. 2** zeigt modellartig die Wirkungsweise der Substanz DSS.

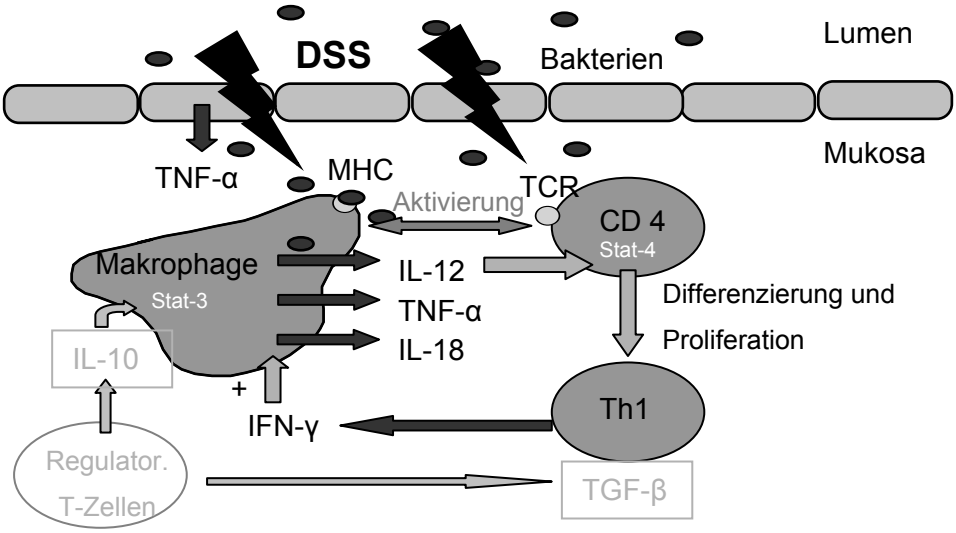


Abbildung 2: Paradigmatische Wirkung von Zytokinen in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Trotz der weitgehenden Unklarheit, was die Pathophysiologie der DSS-induzierten Kolitis angeht, erfreut sich das akute DSS-Modell großer Beliebtheit bei der Testung verschiedener antiinflammatorischer Substanzen. Dabei hat es sich gezeigt, dass bei Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa getestete und klinisch wirksame Substanzen auch unter akuter DSS-Gabe Effektivität zeigen. Monoklonale TNF-α-Antikörper sind im DSS-Modell ebenso wirksam wie Sulfasalazin und IL-10 [Axelsson 1998; Tomoyose 1998; Murthy 1999].

Gerade TNF-α scheint eine wichtige Rolle als gemeinsame inflammatorische Endstrecke vieler experimentellen Kolitismodelle zu spielen. Es wird von intestinalen Makrophagen und Epithelzellen produziert und induziert die Produktion von IFN-γ durch T-Zellen, und zwar unabhängig von IL-12 und IL-18. Diesen beiden Zytokinen wiederum wurde in den letzten Jahren intensive Aufmerksamkeit im Rahmen tierexperimenteller Studien geschenkt. Beide Zytokine sind wichtig für die Aktivierung mukosaler T-Zellen und ihre Differenzierung zu Th1-Zellen. Neurath et al. wiesen nach, dass Anti-IL-12-Antikörper in experimentellen Kolitismodellen wirksam ist [Neurath 1995]. Kürzlich erst wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Gabe von Anti-IL-18-Antikörper die akute DSS-induzierte Kolitis lindert [Siegmund 2001 a]. Fest steht, dass bisher kein einheitliches Paradigma von der Wirkung pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis existiert. In letzter Zeit wurde die Frage aufgeworfen, ob die akute DSS-induzierte Kolitis ein klar Th1-vermitteltes Geschehen wie den Morbus Crohn simulieren kann oder eher ein reines Epithelschadensmodell ist. Einen Beitrag zur Klärung der Pathophysiologie dieses Modells zu leisten, ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit.

1.6 Zielsetzung

Somit verfolgt die vorliegende Arbeit zwei Hauptziele. Zum einen soll überprüft werden, ob der ICE-Inhibitor Pralnacasan im Modell der DSS-induzierten Kolitis wirksam ist. Kapitel 3.1 beschäftigt sich mit dieser Frage. In Kapitel 3.2 liegt der Schwerpunkt auf der näheren Charakterisierung der Pathophysiologie der DSS-induzierten Kolitis. Der ICE-Inhibitor Pralnacasan wurde als Instrument zur Klärung der Rolle von ICE und damit der Zytokine IL-18 und IL-1β im Modell der DSS-induzierten Kolitis verwendet. Des weiteren beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Frage, welche Parameter sich als Endpunkte der DSS-induzierten Kolitis eignen. Zudem wird untersucht, ob ein synergistischer Effekt von Pralnacasan mit TNF-α-reduzierenden Substanzen besteht und ob die Substanz auch in alternativen Modellen wirksam ist. Schließlich wird die Wirkung von MCP-1 in der Pathogenese des DSS-Modells untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Substanzen

2.1.1 Pralnacasan

Der Interleukin-1β-converting-enzyme-Inhibitor Pralnacasan wurde freundlicherweise von der Aventis AG (Frankfurt am Main, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Pralnacasan wurde von Vertex Pharmaceuticals (Cambridge, MA, USA), einer Tochterfirma von Aventis, entwickelt. Zur oralen Applikation wurde Pralnacasan in 0,5% Hydroxyethylcellulose (HEC, Ch-B S29089015, Schuchard, Deutschland) Lösung suspendiert. Hierzu wurde Pralnacasan in einem Ultraschallbad (Sonorex super RK 510 H, Bandelin electronik, Berlin, Deutschland) unter ständigem Rühren in Suspension gebracht. Für die intraperitoneale Gabe wurde Pralnacasan im Ultraschallwasserbad unter ständigem Rühren in 25% Cremophor EL (BASF, Ludwigshafen, Deutschland) gelöst und anschließend durch Sterilfilter (0,2 µm, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA) filtriert. Die Zubereitung wurde an jedem Versuchstag angefertigt.

2.1.2 Rolipram

Der Phosphodiesterase Typ IV-Inhibitor Rolipram wurde von der Firma Schering AG (Berlin, Deutschland) bezogen und wie von Hartmann et al. beschrieben in destilliertem Wasser gelöst [Hartmann 2000].

2.1.3 Dextran-Sulfat-Sodium

Dextran-Sulfat-Sodium (DSS) mit einem Molekulargewicht von 40.000 Dalton wurde bei ICN Biomedicals GmbH (Eschwede, Deutschland) bezogen. Um eine Lösung mit der Konzentration 3,5% herzustellen, wurden 35 g DSS in 1 l Wasser gelöst. Diese Lösung wurde während eines Versuches an jedem vierten Tag neu hergestellt und ausgetauscht.

2.1.4 TNBS

TNBS (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid) wurde als fünfprozentige Lösung von Sigma Deutschland (hier erhältlich unter der Bezeichnung Picrylsulfonic acid P-2297) erworben.

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Tierversuchsantrag

Für die Versuchsvorhaben wurde ein Tierversuchsantrag nach §8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes für die Bundesrepublik Deutschland (BGB1 1986) an die Regierung von Oberbayern gestellt und genehmigt.

2.2.2 Tierbeschaffung

Als Versuchstiere wurden 6-8 Wochen alte, 20-22 g schwere weibliche Bagg-albino/c (Balb/c)-Mäuse (Harlan Winkelmann, Borchen, Deutschland) eingesetzt [Dieleman 1998; Hartmann 2000]. Des weiteren kamen C57BL/6 Mäuse (Harlan Winkelmann, Borchen, Deutschland) zum Einsatz. MCP-1 (-/-) Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe M. Voskuil (Academic Medical Center, Amsterdam, Niederlande) bezogen.

2.2.3 Tierhaltung

Die Mäuse wurden frühestens eine Woche nach Lieferung in einen Versuch aufgenommen, so dass genug Zeit zur Akklimatisierung bestand. Sie wurden in dem Tierstall der Medizinischen Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) bei einer Luftfeuchtigkeit von 65%, einer Raumlufttemperatur von 22°C und einem 12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Maximal zehn Mäuse teilten sich einen Käfig mit Edelstahlabdeckung. Die Tiere erhielten kommerziell erhältliches Standardmäusefutter und in Abhängigkeit der Versuchsgruppe mit DSS versetztes oder reines Trinkwasser *ad libitum*.

2.2.4 Anästhesie der Mäuse und Beendigung der Versuche

Um bei den Mäusen eine ausreichende Anästhesie von etwa 90 Sekunden Dauer zu erreichen, wurden sie in einen Glasbehälter gesetzt, der in Isofluran (Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden) getränkten Zellstoff enthielt. Innerhalb von 30 Sekunden waren die Tiere ausreichend narkotisiert, um sie durch zervikale Dislokation zu töten. Diese Methode ist in Übereinstimmung mit den deutschen Tierschutzgesetzen geeignet, den Tod der Maus in Bruchteilen von Sekunden herbeizuführen.

2.2.5 Darmpräparation und Gewinnung von Gewebematerial

Nach dem Tod der Maus wurde das Abdomen eröffnet, das Kolon präpariert und mit einem Lineal die Länge bestimmt. Aus dem Colon transversum wurde ein 5 mm langes Darmstück entnommen und für die histologische Analyse in Formaldehyd eingelegt. Zum Zytokinnachweis wurden 0,5 cm lange Stücke des distalen Kolons entnommen und in Protein Extraction Reagent (Pierce, Rockford; Illinois, USA) überführt. Die Proben wurden

sofort bei –196°C in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die 0,5 cm langen Darmstücke des distalen Kolon, die für die mRNA-Extraktion isoliert wurden, kamen in Eppendorf Reaktionsgefäße und wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Paraaortale Lymphknoten und Milzen wurden freipräpariert und in 1 ml Kulturmedium aufgenommen.

2.3 Kolitisaktivität

2.3.1 Klinischer Score

Um das Ausmaß der Kolitis zu bewerten, wurde täglich von zwei Untersuchern in geblindeter Art und Weise ein klinischer Score bestimmt (**Tabelle 1**). Das Scoring setzte sich aus drei Parametern zusammen: Stuhlkonsistenz, Gewichtsverlust sowie Blut im Stuhl [Hartmann 2000; Siegmund 2001 d]. Die Mäuse wurden jeden Morgen vor Applikation der Testsubstanzen gewogen. Zur Bestimmung des Gewichts wurde eine Waage mit einer Genauigkeit von ±0,5 g Wägebereich verwendet. Bewertet wurde der Gewichtsverlust in Prozent, wobei unverändertes Gewicht oder Gewichtszunahme mit keinem Scorepunkt, ein Gewichtsverlust unter 5% mit einem Punkt, sowie Gewichtsverluste von 5,1% bis 10%, 10,1 bis 20% und über 20% mit jeweils zwei, drei oder vier Punkten bewertet wurden. Zudem wurde ein Hämoccult-Test (SKD Pharma GmbH, Griesheim, Deutschland) mit Stuhlproben von jeder Maus durchgeführt. Zur Untersuchung der Stuhlkonsistenz wurde dieser auf dem Hämocculttestbrief ausgestrichen und mit null bei harter Konsistenz, mit zwei bei weicher Konsistenz und mit vier bei flüssigem Stuhl bewertet. Anschließend wurde das Hämoccult-Ergebnis verblindet abgelesen und mit einem Score von null bewertet, wenn kein Blut nachzuweisen war, mit zwei, wenn okkultes Blut im Stuhl war und mit vier, wenn das Blut makroskopisch als rektale Blutung am After der Maus zu erkennen war. Der Mittelwert aus den drei Parametern bildete den klinischen Score. Ein Score von 0 entspricht somit gesunden Tieren; ein Score von 4 markiert klinisch schwer kranke Versuchsmäuse.

Punkte	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Gewichtsverlust	0%	<5%	5,1-10,0%	10,1-20%	>20%
Stuhlbeschaffenheit	Geformt		Breiig		Flüssig
Blut im Stuhl	Negativer Hämoccult		Positiver Hämoccult		Sichtbare Blutung

Tabelle 1: Berechnung des klinischen Scores aus den Parametern Gewichtsverlust, Stuhlbeschaffenheit und Blut im Stuhl, modifiziert nach Cooper et al. [Cooper 1993].

2.3.2 Histologischer Score

Am Abschlusstag wurden die Mäuse gewogen und der Versuch durch Euthanasie der Mäuse beendet. Die in Formaldehyd eingelegten Darmteile wurden von Prof. Dr. H. A. Lehr (Pathologisches Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) verblindet untersucht und entsprechend des histologischen Scores bewertet.

Bewertet wurde der histologische Score in Anlehnung an das von Dielemann [Dieleman 1994] beschriebene Schema (**Tabelle 2**). Dabei wurde die Infiltration der Darmwand mit Entzündungszellen sowie das Ausmaß der Gewebeschäden beurteilt. Es wurden für jeden dieser Parameter Punkte von 0 bis 3 (0, keine Zellinfiltration bzw. kein Gewebeschaden bis 3, starke Entzündungsreaktion bzw. starker Gewebsschaden) vergeben. Anschließend wurden die Scorepunkte addiert und dadurch ein histologischer Score von 0 bis 6 gebildet.

Scorepunkte	**0**	**1**	**2**	**3**
Infiltration inflammatorischer Zellen	Kaum in Lamina propria	Zunehmend in Lamina propria	Konfluenz bis Submukosa	Transmural
Gewebeschädigung	Keine	Lymphoepitheliale Läsionen	Erosionen der Mukosa	Tiefere Wandschichten

Tabelle 2: Aufbau des histologischen Scores bestehend aus der Analyse der Infiltration inflammatorischer Zellen und der Gewebeschädigung, modifiziert nach Lehr et al. [Lehr 1997].

Um eine exaktere histologische Beurteilung mit funktionellen Aussagen zu ermöglichen, wurden im Falle des MCP-1 (-/-) Versuchs in der histologischen Analyse monozytäre und granulozytäre Infiltration getrennt bewertet. Der Epithelschadensscore bewertete die Parameter Kryptenverlust, Erosion, Fibrose und ödematöse Verquellung separat. Die Beurteilung wurde nach Verblindung durch Professor ten Kate (Academic Medical Center, Niederlande) durchgeführt.

2.4 Praktische Durchführung des Kolitis-Modells

2.4.1 Prophylaktisches Modell der DSS-induzierten Kolitis

Über einen Zeitraum von elf Tagen wurden den Balb/c Tieren 3,5% DSS (MW 43.000 Dalton), in Trinkwasser gelöst, verabreicht. Kontrollmäuse erhielten während derselben Zeit DSS-freies Trinkwasser. Die Therapie erfolgte parallel zur Kolitisinduktion einmal pro Tag durch orale oder intraperitoneale Applikation der suspendierten oder gelösten Substanzen. Vom ersten bis zum zehnten Tag der DSS-Gabe wurde der klinische Score ermittelt; am elften Tag wurde der Versuch beendet. C57BL/6 Mäuse erhielten 1,5% DSS.

2.4.2 Therapeutisches Modell der DSS-induzierten Kolitis

Den Balb/c Mäusen wurde acht Tage lang 3,5% DSS-haltiges Trinkwasser *ad libitum* verabreicht. Am achten Tag wurde die DSS-Lösung gegen reines Trinkwasser ausgetauscht und den Tieren ab nun zweimal täglich 50 mg/kg Pralnacasan intraperitoneal verabreicht. Am dreizehnten Tag wurde der Versuch beendet.

2.4.3 Modell der TNBS-induzierten Kolitis

Zur Induktion der Kolitis wurde Balb/c Mäusen 100µl TNBS-Lösung mit 40% Alkoholanteil bei einer Gesamtdosis von 2 mg TNBS intrarektal appliziert. Die Versuchstiere wurden zu diesem Zweck mit Isofluran anästhetisiert. Die stumpfe Metallkanüle (Sherwood Davis and Geck, Schweiz) wurde mit einem Plastiksonde versehen, um Verletzungen des Anus zu minimieren und anschließend drei cm in den Anus der Versuchsmaus eingeführt. Es wurden 100 µl der TNBS-Lösung appliziert, die Sonde zurückgezogen und der Anus der Maus für eine Minute mit der Hand verschlossen, um die Resorption des TNBS zu ermöglichen. Der vierzigprozentige Alkoholanteil der Lösung zerstört bei dieser Prozedur die Epithelbarriere, so dass TNBS die Mukosa überwinden und direkt mit den Lamina propria Immunzellen in Kontakt treten kann. Am siebten Tag des Versuchs wurde in derselben Prozedur nochmals TNBS intrarektal appliziert („Rechallenge“).

2.4.4 Durchführung der Medikamentenapplikation

Bei der intaperitonealen Applikation wurden 200 µl der Flüssigkeiten über eine 1ml Tuberkulinspritze mit einer 24 G-Nadel gezielt in den rechten oder linken unteren Quadranten des Abdomens injiziert. Zur oralen Applikation wurden die Substanzen mit einer 1 ml Tuberkulinspritze und einer stumpfen Metallsonde (Sherwood Davis and Geck, Schweiz) bei überstrecktem Hals der Maus direkt in den Ösophagus verabreicht.

2.5 Zellkultur, Durchflusszytometrie und Zytokinbestimmung

2.5.1 Kulturmedium und Inkubation

RPMI 1640 wurde mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES (N-(2-Hydroethylpiperazin)-N´-(2-Ethanolsulfonsäure), Sigma, München), 1% (v/v) humanem Serum und 1% (w/v) Humanalbumin (Behringwerke, Marburg) versetzt. Dabei wurden ausschließlich endotoxinfreie Medien und Substanzen verwendet, um eine unspezifische Stimulation zu vermeiden. Um Komplementfaktoren zu inaktivieren wurde das verwendete humane Serum für 30 min bei 56°C im Wasserbad inaktiviert. Das Kulturmedium wurde sowohl für die Kultivierung der Zellen wie auch für die Herstellung der einzelnen Lösungen verwendet.

2.5.2 Lymphozytenzellkultur

Bei Beendigung des Versuchs am elften Tag wurden die paraaortalen Lymphknoten freipräpariert und in Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurden sie mechanisch zerkleinert und daraus Zellsuspensionen gewonnen [Coligan 1992]. Die Zellen wurden gewaschen und in Zellkulturmedium, das 10% FCS, PMA (10 ng/ml), Ionomycin (500 ng/ml) sowie Brefeldin A (1 µg/ml) enthielt, in einer Konzentration von 2,5 x 10^6/ml resuspendiert. Die Zellen wurden in 48-well Zellkulturplatten (Falcon, NJ, USA) ausplattiert und in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) mit 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären IFN-γ-Expression erfolgte nach 18 Stunden Inkubation.

2.5.3 Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden 2 x 10^6 Zellen pro Probe verwendet. Die Zellen wurden einem Fixations- und einem Permeabilisierungsmedium (An der Grub, Kaumberg, Austria) ausgesetzt und anschließend mit FITC-labeled Anti-Maus-IFN-γ-

Antikörper (Becton Dickinson, Heidelberg) intrazellulär gefärbt. Die Analyse erfolgte mit einem FACS Calibur Instrument (Becton Dickinson, Heidelberg).

2.5.4 Splenozytenkultur und Zytokinbestimmung

Die Milzen wurden freipräpariert und in Zellkulturmedium überführt. Zellsuspensionen wurden hergestellt, indem die Milzen durch einen 100 µm Nylon cell strainer (Falcon) gepresst, gewaschen und in einen Erythrozyten-Lysepuffer (Ortho Clinical Diagnostics GmbH, Neckargmünd) aufgenommen wurden. Die Zellen wurden für zwölf Minuten inkubiert, zweimal in RPMI Medium gewaschen, in 10% FCS-haltiges Zellkulturmedium aufgenommen und in einer Konzentration von 2,5 x 10^6/ml in 48-well Platten inkubiert. Zur Stimulation der Splenozyten enthielten die Kulturen PMA (10 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml). Nach 20 Stunden wurde die Inkubation durch Einfrieren der Platten bei –70°C beendet. Um Überstand und Lysat der Splenozytenkultur zu erhalten, wurden die Platten drei Frier-Tau-Zyklen unterzogen. Die Gesamtkonzentration an IFN-γ wurde mit Hilfe eines ELISA (Endogen, Woburn, MA, USA) quantifiziert.

2.5.5 Zytokinbestimmung in Kolongewebe

Kolonstücke von 5 mm Länge wurden mit einem Skalpell zerkleinert, in 200 µl Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce, Rockford, USA) überführt und schockgefroren. Zur Bestimmung der Konzentration an Zytokinen wurde das Homogenat mit 10000 g bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde für die weiteren Messungen verwendet. Die Menge an Gesamtprotein wurde mit Hilfe einer Bradford Analyse bestimmt. BioRad Protein Assay (BioRad Laboratories, München) wurde als Färbereagenz verwendet. Die Menge an IL-18, TNF-α, IFN-γ und IL-12 wurde mit OPTEIA-ELISAs von Pharmingen quantifiziert (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Die IFN-γ-Bestimmung erfolgte alternativ mit ELISAs der Firma Endogen (Woburn, MA, USA). Zur Messung der IL-1β-Spiegel kam ein ELISA-System von Bender MedSystems (Wien, Österreich) zum Einsatz. Die Bestimmung von MIP-1α, KC, IL-5 und IFN-γ erfolgte unter Verwendung des Luminex-Instruments (Austin, TX, USA).

2.6 RNA-Extraktion und reverse Transkription

Nach der Entnahme und dem Waschen des distalen Kolons wurden 5 mm lange Stücke in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Extraktion der Gesamt-RNA wurde die Probe in den Lyse-Puffer des Roche Total RNA Tissue Extraction Kit (Roche, Mannheim) überführt und mit einem Ultra Turrax-Gerät (Janke und Kunkel, Staufen im Breisgau) homogenisiert.

Anschließend wurde die Extraktionsprozedur mit Hilfe eines Filtersystems gemäß den Anweisungen des Kits weitergeführt. Nach einem fünfzehnminütigen DNase-Verdau folgten drei Waschschritte. Zuletzt wurde die RNA in 100 µl Elutionspuffer (= aqua dest.) aufgenommen. Die RNA wurde entweder sofort dem RT-Schritt unterzogen oder nach Zugabe von 85 µl absolutem Ethanol bei –85°C gelagert. Zur Weiterverarbeitung der gelagerten RNA wurde die Probe mit 12.000 *g* bei 4°C zentrifugiert und das Pellet einmal mit eisgekühltem 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet für zehn Minuten unter der Flow getrocknet, um das Verdunsten des Restalkohols zu garantieren. Anschließend wurde die Probe in genau die Menge Wasser aufgenommen, die vor Beginn der Lagerung vorhanden war.

Die Reinheit und Ausbeute der RNA-Extraktion wurde durch spektroskopische Analyse bestimmt. Anschließend wurde die Konzentration der RNA in den verschiedenen Proben einer Versuchsreihe äquilibriert. Zur Durchführung der reversen Transkription (RT) wurden M-MLV Reverse Transkriptase inklusive DTT und Puffer (Gibco Life Technologies, Paisley, UK), RNase Inhibitor (Roche, Mannheim, Germany), oligo(dT) Primer für die cDNA-Synthese (Roche, Mannheim, Germany) und dNTP (Promega, Madison, Wisconsin, USA) verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt neben 28 µl der Probe und 10 µl Transkriptionspuffer jeweils 2,5 µl oligo(dT)- und dNTP-Lösung sowie jeweils 2,0 µl DTT und RNase-Inhibitor in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß. Der Ansatz wurde im Wasserbad bei 60°C für zwei Minuten inkubiert. Kondensierte Flüssigkeit wurde abzentrifugiert, die Reaktion wurde sofort auf Eis gestellt und mit 1 µl RNase Inhibitor sowie 2 µl M-MLV reverser Transkriptase vervollständigt. Der Reaktionsansatz wurde für 1,5 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zum Abschluss der Reaktion wurden die Eppendorf-Gefäße für drei Minuten im Wasserbad auf 95°C erhitzt. Die kondensierte Flüssigkeit wurde abzentrifugiert und die DNA bei –20°C gelagert.

2.7 Konventionelle PCR

Zur Durchführung der konventionellen PCR wurde TaqDNA Polymerase und PCR-Pufferlösung von Roche (Mannheim, Deutschland) verwendet, daneben die oben beschriebenen dNTPs. Gemäß Anweisungen aus der Literatur [Autenrieth 1997; Ajuebor 2002] wurden von der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt, Germany) Primerpaare für β-Aktin, TNF-α, MCP-1 und KC synthetisiert (**Tabelle 3**). β-Aktin wurde als housekeeping gene verwendet.

Tabelle 3: Primer Sequenzen

Murines β-Aktin	348 BP
Sense	5´- TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C - 3´
Antisense	5´- TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G - 3´
Murines TNF-α	307 BP
Sense	5´- GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC - 3´
Antisense	5´- ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG - 3´
Murines MCP-1	274 BP
Sense	5´- ACT GAA GCC AGC TCT CTC TTC CTC - 3´
Antisense	5´- TTC CTT CTT GGG GTC AGC ACA GAC - 3´
Murines KC	454 BP
Sense	5´- GGA TTC ACC TCA AGA ACA TCC AGA G - 3´
Antisense	5´- CAC CCT TCT ACT AGC ACA GTG GTT G 3´

Ein PCR-Reaktionsansatz enthielt jeweils 5 µl Pufferlösung, 2,5 µl dNTP und Primer sowie 1 µl Taq Polymerase. Wir setzten 10 µl cDNA ein und ergänzten mit 29 µl aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 50 µl. In Vorversuchen hatte sich diese Zusammenstellung als optimal erwiesen. Versuche mit der Methodik der *nested PCR* hatten gezeigt, dass dieses Verfahren in unserem Fall wenig zweckdienlich ist. Ebenfalls in Vorversuchen wurde gezeigt, dass eine Zyklenzahl von 40 PCR-Zyklen eine optimale Auswertung ermöglicht. Das Zyklusprofil der PCR-Reaktion gibt **Tabelle 4** wider. Im Anschluss wurden 20 µl der PCR-Reaktion mit 2 µl Gelauftragspuffer versetzt und in die Taschen eines Agarosegels überführt. In einer Elektrophoresekammer wurden die Gele einer Spannung von 80 Volt ausgesetzt, die Banden in der Dunkelkammer unter UV-Licht begutachtet und mit Polaroid-Negativfilmen abgelichtet. Zur weiteren Auswertung wurde die optische Dichte der Banden digital bestimmt. Die optische Dichte der TNF-α-, MCP-1- und KC-Banden wurde in Beziehung gesetzt zur optischen Dichte der jeweiligen β-Aktin-Bande. Auf diese Weise konnten relative Werte der mRNA-Expression in Kolon und Lymphknoten bestimmt werden.

Phase	**Zeit**	**Temperatur**
I	5 Minuten	95°C
II	20 Sekunden 30 Sekunden 40 Sekunden	94°C 55°C 72°C
III	5 Minuten	72°C

Tabelle 4: PCR-Zyklusprofil

Zyklus II wurde 40fach wiederholt. Bei dieser Zyklenzahl ergab sich die beste Trennschärfe zwischen den einzelnen Banden im Agarosegel.

2.8 *Real-time*-PCR

Real-time-PCR ermöglicht eine absolute Quantifizierung der mRNA-Expression. Das Hauptproblem bei der Quantifizierung von PCR-Daten besteht darin, dass die Reaktion – in Abhängigkeit von der Ausgangsmenge an DNA, der Menge eingesetzter Taq Polymerase und den gewählten PCR-Bedingungen – zwischen dem 40. und 50. Zyklus ein Plateau erreicht, bei dem es zu keiner weiteren Amplifikation der DNA in dem PCR-Ansatz kommt. *Real-time*-PCR-Verfahren bedienen sich einer cycle-by-cycle-monitoring-Technik. Dabei wird die Fluoreszenz nach jedem Zyklus gemessen und als Maß für die aktuell vorhandene Menge an cDNA verwendet. Durch die Verwendung von Standards mit bekannter Ausgangsmenge an cDNA ist es möglich, eine exakte Anzahl an Kopien im jeweiligen Reaktionsansatz zu berechnen.

Es wurde das Light Cycler-Instrument der Firma Roche verwendet, dazu das Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I Kit (Roche, Mannheim). Primer für murines GAPDH, IP-10 (CXCL-10), TNF-α und IL-18 wurden als Light Cycler-Primer-Sets von der Firma Search-LC in Heidelberg bezogen. Pro Ansatz wurden 2 µl Primer, 2 µl Fast Start Master SYBR Green I und 6 µl Wasser als Master Mix vorbereitet und in die Light Cycler-Kapillaren (Roche, Mannheim) übertragen. Dazu wurden 10 µl des cDNA-*templates* gegeben. Die Kapillaren wurden in Light Cycler-Kapillarenblöcken (Roche, Mannheim) drei Minuten bei 500 g zentrifugiert und anschließend in einen zum Light Cycler-Instrument gehörigen Rotor gesteckt. Dieser Rotor ermöglicht die Messung der Fluoreszenz jeder einzelnen Probe nach einem Zyklus. Die Einstellungen der PCR-Prozedur am Rechner des Light Cycler Instruments sind in **Tabelle 5** zusammengefasst.

Nach jedem Light Cycler-Lauf wurde von dem Gerät automatisch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, wodurch eine exakte Aussage über die Größe des Amplifikats und damit die Spezifität der PCR-Reaktion möglich wurde. Die Schmelzkurvenanalyse wurde für jeden Primer nochmals bestätigt, indem die Amplifikate eines Laufes auf ein Agarosegel aufgetragen und das PCR-Produkt unter UV-Licht begutachtet wurde.

Aus den Fluoreszenzkurven der einzelnen PCR-Proben errechnete der dem Gerät angeschlossene Computer sogenannte Kreuzungspunkte, die ein Maß für die eingesetzte Menge an cDNA darstellen. Zur Berechnung der Kreuzungspunkte wurde die zweite Ableitung der Fluoreszenzkurve bestimmt. Es wurde also diejenige Zyklenzahl, bei der es zu

einer maximalen Zunahme der Fluoreszenzaktivität im Vergleich zur Vorprobe kam, als Kreuzungspunkt definiert. Durch Rückgriff auf die Standardkurven konnte eine Kopienzahl für jede einzelne Probe bestimmt werden. Die Kopienzahl von TNF-α, IL-18 und IP-10 jeder Probe wurde in Beziehung zur Kopienzahl des housekeeping-Genes GAPDH gesetzt.

Tabelle 5: Einstellungen der Light Cycler Prozedur

Denaturierung	Zyklenzahl	1		
	Zieltemperatur	95 °C		
	Inkubationszeit	10 Minuten		
Amplifikation	Zyklenzahl	35 Zyklen		
		Segment 1	Segment 2	Segment 3
	Zieltemperatur	95 °C	68 °C	72 °C
	Inkubationszeit	10 Sekunden	10 Sekunden	16 Sekunden

2.9 Statistische Methoden

Daten werden im Folgenden als Mittelwerte ± SEM angegeben. Die Berechnung statistischer Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen erfolgte durch ungepaarten Student-t-Test. Statistische Signifikanz von Differenzen wurde für p-Werte unter 0,05 angenommen. Für die Statistik wurden das Programm Stat View 512 (Abacus Concepts, Calabasas, California, USA) verwendet, für die weitere Datenaufbereitung Microsoft Excel 2000. Als Textverarbeitungsprogramm diente Microsoft Word 2000. Zur Erstellung von Grafiken wurde Microsoft Power Point 2000 eingesetzt. Zur Auswertung der ELISA- und Bradford-Tests wurde Claris Works verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Der Interleukin-1β-converting-enzyme-Inhibitor Pralnacasan lindert die DSS-induzierte Kolitis

3.1.1 Klinischer Verlauf der DSS-induzierten Kolitis unter Pralnacasan

Zur Überprüfung der Wirksamkeit von Pralnacasan in einem prophylaktischen Modell der DSS-induzierten Kolitis kamen in einer ersten Versuchsreihe insgesamt 36 Balb/c Mäuse zum Einsatz. Die Tiere wurden auf eine Kontrollgruppe, drei therapeutische Gruppen sowie eine Vergleichsgruppe, die lediglich Trägermedium erhielt (fortan Placebogruppe genannt), aufgeteilt. Alle Mäuse außer den vier Tieren der Kontrollgruppe erhielten 3,5 Prozent DSS im Trinkwasser verabreicht. Als Trägersubstanz für Pralnacasan verwendeten wir in den p.o. Gruppen HEC; bei Mäusen, die Pralnacasan i.p. appliziert bekamen, wurde 25 Prozent Cremophor EL verwendet, um die Sterilfiltration der Lösung zu ermöglichen. Bei zwei Mausgruppen wurden 25 mg pro kg Körpergewicht des ICE-Inhibitors Pralnacasan zweimal täglich intraperitoneal, bzw. per os verabreicht. Eine weitere Gruppe wurde zweimal täglich mit 12,5 mg/kg KG Pralnacasan p.o. behandelt. Um eventuelle Nebenwirkungen des Medikaments beurteilen zu können, erhielten die Kontrolltiere ebenfalls Pralnacasan. Alle Gruppen, die DSS erhielten, bestanden initial aus acht Versuchstieren (**Tabelle 6**). Die Gabe erfolgte über zehn Tage; am elften Tag wurde der Versuch beendet und Material für die *ex vivo*-Untersuchungen gewonnen.

Tabelle 6: Experimentelle Anordnung zur Evaluierung der Wirksamkeit von Pralnacasan

Gruppe	**Trägerlösung**	**Anzahl**	**Art der Gabe**	**Pralnacasan (mg/kg)**
DSS + HEC	0,5% HEC	8	p. o.	0
DSS + Pralnacasan	25% Cremophor EL	8	i. p.	50 bid
DSS + Pralnacasan	0,5% HEC	8	p. o.	12,5 bid
DSS + Pralnacasan	0,5% HEC	8	p. o.	50 bid
Pralnacasan	25% Cremophor EL	2	i. p.	50 bid
Pralnacasan	0,5% HEC	2	p. o.	50 bid

Mäuse, die DSS erhielten, entwickelten beginnend ab Tag 4 eine typische Kolitissymptomatik mit Durchfall und Blutauflagerung im Stuhl. Die Symptome manifestierten

sich in einem erhöhten klinischen Score; per Definition entspricht dabei ein klinischer Score größer als 0,5 einer Kolitis. Der Unterschied zur Kontrollgruppe war ab Tag 6 statistisch signifikant (**Abb. 3**). Die intraperitoneale Gabe von 50 mg/kg bid Pralnacasan reduzierte den klinischen Score unter DSS-Applikation signifikant. Das Signifikanzniveau im Vergleich zur Placebogruppe wurde an den Tagen 6 (score 0,5 ± 0,1 versus 1,6 ± 0,3; $p < 0,001$) bis 10 (score 1,2 ± 0,3 versus 2,6 ± 0,5; $p = 0,038$) erreicht. Die orale Gabe von 50 mg/kg bid Pralnacasan reduzierte ebenfalls die Kolitissymptomatik. Der Unterschied dieser Gruppe zur Placebogruppe war an den Tagen 8 (score 1,3 ± 0,2 versus 2,4 ± 0,4; $p = 0,034$) und 9 (score 1,5 ± 0,2 versus 2,7 ± 0,5; $p = 0,046$) statistisch signifikant, verfehlte das Signifikanzniveau aber an Tag 10.

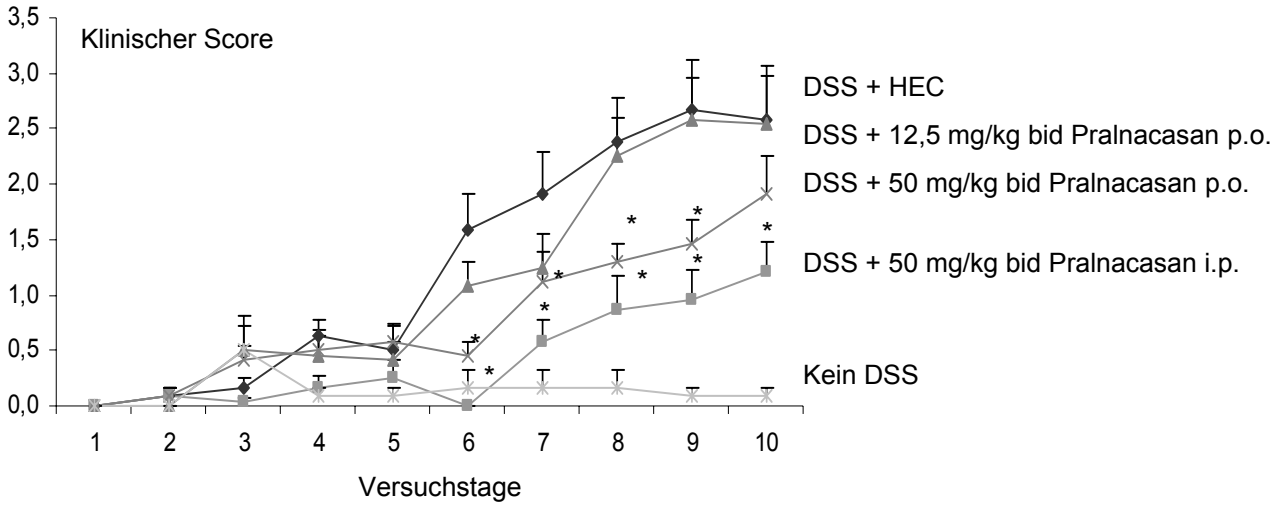


Abbildung 3: Klinischer Score. Die intraperitoneale Gabe von 50 mg/kg KG bid Pralnacasan verringerte die Symptomatik, die die Versuchstiere unter DSS-Gabe entwickelten. In den Score gingen die Parameter Gewichtsverlust, Diarrhö und positiver Hämoccult mit ein.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den DSS-exponierten Tieren, die 12,5 mg/kg bid Pralnacasan p.o. erhielten und der DSS-exponierten Placebogruppe ließ sich nicht feststellen. In dieser Gruppe mit geringdosierter Pralnacasangabe per os starben drei Mäuse während des Experiments: Eine Maus verstarb am achten Tag ohne kolitische Symptomatik, jedoch mit ausgeprägtem Gewichtsverlust von 35 Prozent, was auf einen kausal von der DSS-Gabe unabhängigen Tod hinweist. Zwei Mäuse dieser Gruppe gingen am zehnten Tag mit schwerer Kolitis zugrunde. In der Placebogruppe verstarb eine Maus an der DSS-Kolitis am neunten Tag des Experiments.

3.1.2 Darmlänge und histologischer Score

Die Verabreichung von DSS führte zu einer Reduzierung der Kolonlänge (**Abb. 4**) Pralnacasan konnte diese Verkürzung abschwächen. Die mittlere Kolonlänge in allen Pralnacasan-behandelten DSS-exponierten Gruppen war signifikant länger als in der Placebogruppe: 12,6 ± 0,7 cm in 50 mg/kg bid i.p.-behandelten Mäusen, p = 0,003; 11,1 ± 0,6 cm in 12,5 mg/kg bid p.o.-behandelten Tieren, p = 0,047 und 11,0 ± 0,5 cm in 50 mg/kg bid p.o.-behandelten Mäusen, p = 0,022 gegenüber 9,1 ± 0,5 cm in der Placebogruppe.

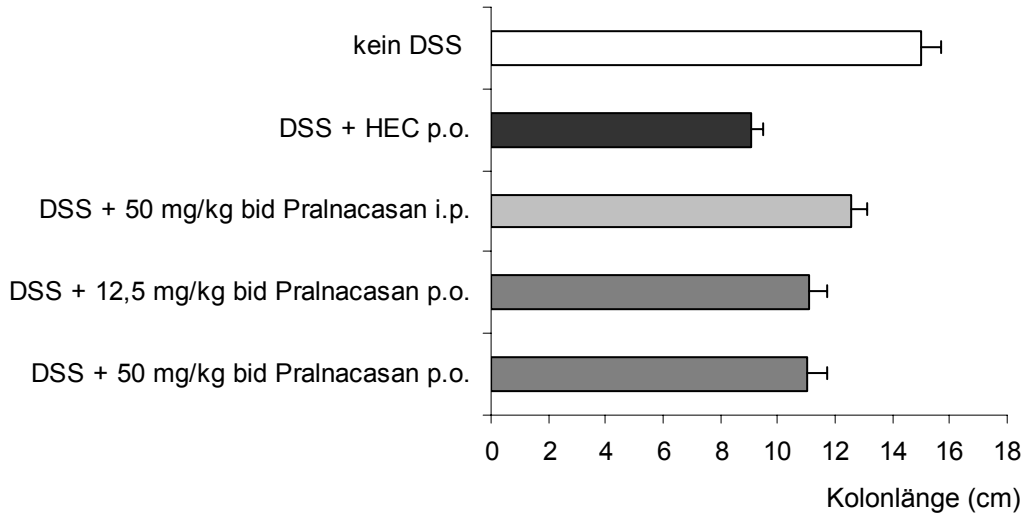


Abbildung 4: Darmlänge. Die Kolonlänge ist ein indirekter Marker des entzündlichen Prozesses im Kolon. Pralnacasan reduzierte die Abnahme der Kolonlänge unter DSS-Gabe.

Die histologische Analyse der Colon transversum-Proben wurde nach Verblindung von einem Pathologen durchgeführt (vgl. Tabelle 2). In allen DSS-exponierten Gruppen waren histologische Anzeichen einer Entzündung nachzuweisen (**Abb. 5**), wohingegen die Proben der Kontrollgruppe keine Anzeichen einer Entzündung aufwiesen (Score 0,0 ± 0,0). Die Gruppe die intraperitoneal mit 50 mg/kg bid Pralnacasan behandelt worden war, zeigte einen Trend in Richtung eines reduzierten histologischen Scores (2,5 ± 0,7; p = 0,204) verglichen mit der Placebogrupppe. Die Werte lagen bei 3,8 ± 0,6 für Tiere, die Placebo erhalten hatten, 3,8 ± 0,8 in der 12,5 mg/kg bid p.o. Gruppe und 3,6 in der 50 mg/kg bid p.o. Gruppe.

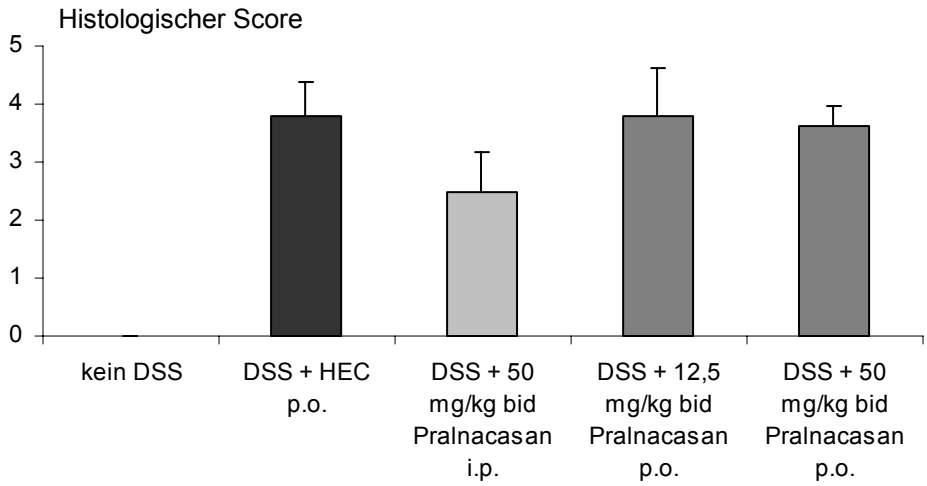


Abbildung 5: Histologische Analyse. Tiere der Pralnacasan i.p. Gruppe zeigten die niedrigsten Scorewerte in der Auswertung durch einen Pathologen nach Verblindung der Proben.

3.1.3 Synthese proinflammatorischer Proteine in Kolongewebe

Die Quantifizierung der Menge an IL-18 in Kolonhomogenat erfolgte durch ELISA-Messung (**Abb. 6**). Die Zytokinmenge wurde in Bezug zur Menge an Gesamtprotein in der jeweiligen Probe gesetzt. Tiere, die kein DSS erhalten hatten, zeigten die geringsten IL-18-Level (152 ± 40 pg/mg Protein, n = 4). Die Gabe von DSS führte zu einer ausgeprägten Zunahme von IL-18 (317 ± 76 pg/mg Protein in der Placebogruppe, n = 5). Die intraperitoneale Verabreichung von 50 mg/kg bid Pralnacasan reduzierte die Konzentration an IL-18 im Vergleich zur Placebogruppe signifikant (113 ± 22 pg/mg Protein, n = 8, p = 0,016). Bei Mäusen, die Pralnacasan peroral appliziert bekommen hatten, konnte keine Reduzierung der Konzentration an IL-18 im Kolonhomogenat festgestellt werden.

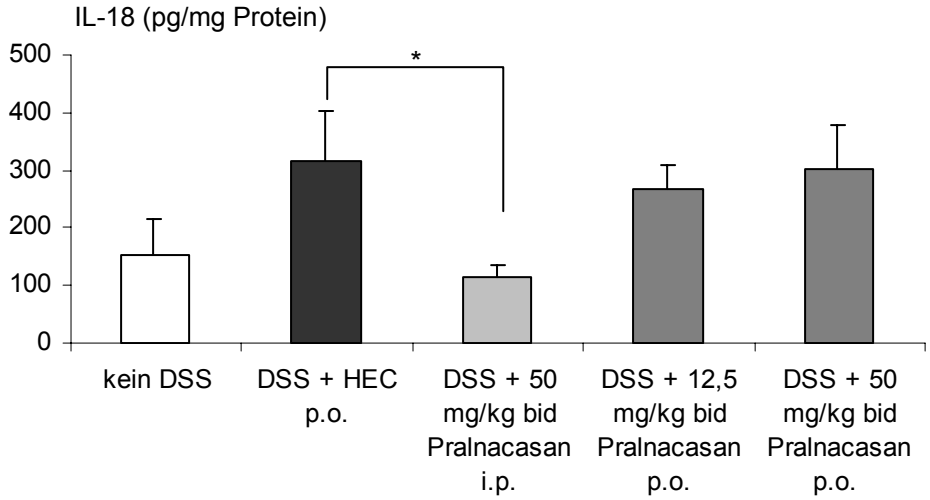


Abbildung 6: Die IL-18-Spiegel im Kolonhomogenat waren nach DSS-Gabe erhöht. Intraperitoneal mit Pralnacasan behandelte Tiere zeigten keine erhöhten IL-18-Spiegel. Pralnacasan hatte die Synthese des proinflammatorischen Zytokins signifikant supprimiert.

IL-1β-Protein stieg unter DSS-Gabe von 340 pg/mg Protein in der Kontrollgruppe auf 950 pg/mg Protein in der DSS-Placebogruppe an. Die intraperitoneale Gabe von Pralnacasan reduzierte diesen Wert auf 360 pg/mg Protein. Die perorale Gabe führte ebenfalls zu einer Reduktion der IL-1β-Spiegel in den untersuchten Mäusen, obgleich keiner dieser Effekte Signifikanzniveau erreichte.

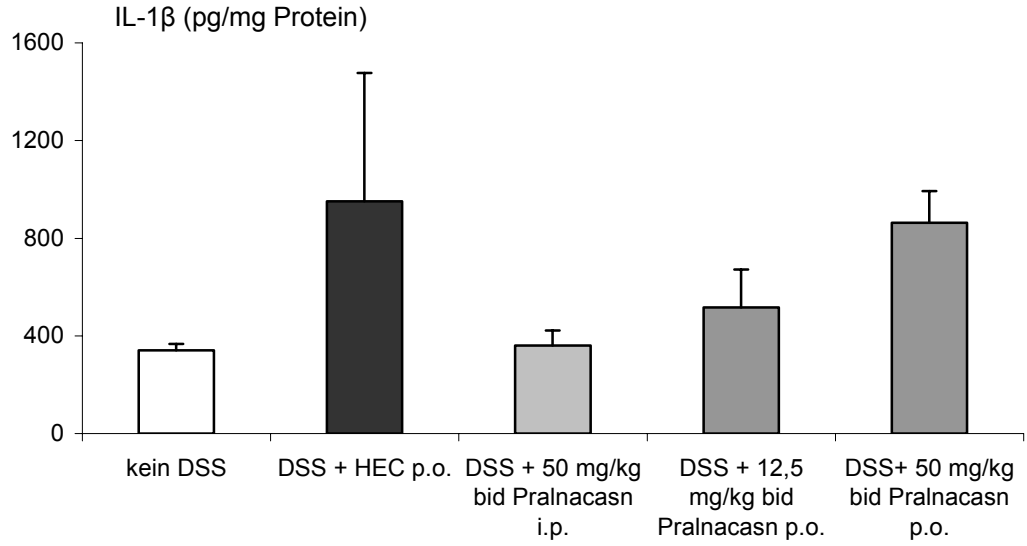


Abbildung 7: Die IL-1β-Spiegel stiegen unter DSS-Gabe an. Die Gabe von DSS erhöhte die Spiegel an IL-1β. Signifikanz erreichte dieser Befund allerdings nicht (p = 0,140).

In dieser Versuchsreihe konnte keine Erhöhung der IFN-γ-Spiegel im Kolonhomogenat unter DSS-Gabe nachgewiesen werden. In den Kontrolltieren fand sich 31 ± 14 pg/mg IFN-γ-Protein. In der Placebogruppe wurde geringfügig mehr IFN-γ nachgewiesen (39 ± 19 pg/mg). In den Pralnacasan-behandelten Tieren wurden IFN-γ-Level von 51 ± 20 pg in der 50 mg/kg bid Pralnacasan i.p. Gruppe, 52 ± 20 pg in der 12,5 mg/kg bid Pralnacasan p.o. Gruppe und 40 ± 14 pg/mg in der 50 mg/kg bid Pralnacasan p.o. Gruppe gemessen.

3.1.4 Produktion von Interferon-γ in paraaortalen Lymphknoten

Weiterhin wurde die Produktion des proinflammatorischen Th1-Zytokins IFN-γ durch Lymphknoten in paraaortalen Lymphknoten untersucht. Lymphflüssigkeit des unteren Gastrointestinaltrakts wird über diese Lymphknoten drainiert. Nach intrazellulärer Färbung mit Anti-IFN-γ-Antikörper wurde der prozentuale Anteil der IFN-γ-produzierenden Zellen an der Gesamtpopulation der Lymphozyten durch FACS-Analyse bestimmt. DSS-Exposition führte zu einer Zunahme des Anteils IFN-γ-produzierender Lymphozyten (**Abb. 8**). In der Placebogruppe (n = 4) waren 84 ± 2% der Lymphozyten IFN-γ-positiv verglichen mit 72 ± 1%

in der Kontrollgruppe, die kein DSS erhalten hatte (n = 4; p = 0,003). Die Wirkung von Pralnacasan auf die IFN-γ-Produktion in paraaortalen Lymphknoten korrelierte mit dessen Einfluss auf den klinischen Score. Die Behandlung mit 12,5 mg/kg bid Pralnacasan zeigte keine Reduzierung des Anteils IFN-γ-positiver Zellen (82 ± 2%; n = 2), wohingegen die perorale Gabe von 50 mg/kg bid Pralnacasan diesen Anteil auf 79 ± 4% senkte (n = 4). Die intraperitoneale Verabreichung von 50 mg/kg bid Pralnacasan reduzierte den Anteil IFN-γ-positiver Lymphozyten statistisch signifikant auf 75 ± 1% (p = 0,021 im Vergleich zur Placebogruppe).

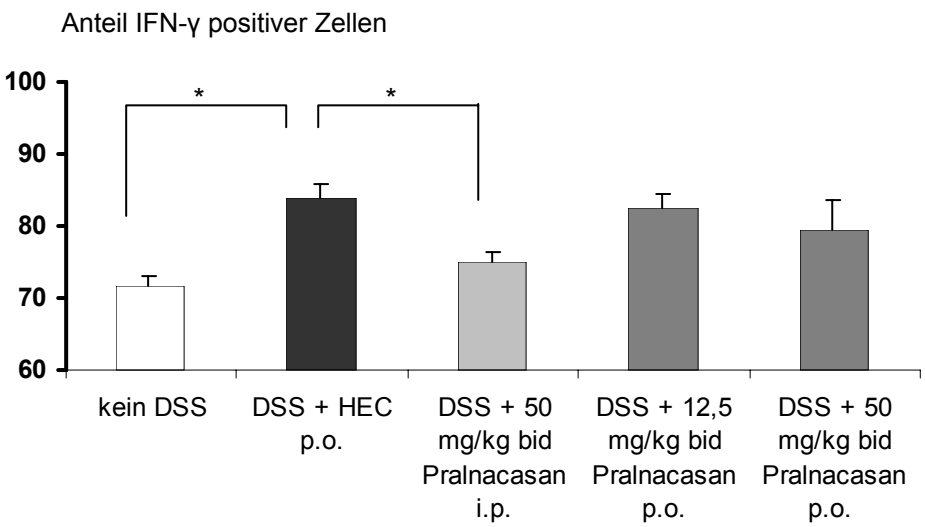


Abbildung 8: Anteil IFN-γ-positiver Zellen aus paraaortalen Lymphknoten nach Stimulation. Nach elftägiger DSS-Gabe fand sich ein prozentual höherer Anteil IFN-γ-positiver Zellen. Intraperitoneale Pralnacasangabe reduzierte diesen Anstieg statistisch signifikant.

3.1.5 *In vitro*-Synthese von Interferon-γ durch Splenozyten

Um den systemischen Effekt von Pralnacasan auf die Suppression der IFN-γ-Synthese zu beurteilen, wurden Splenozyten über 20 Stunden unter Stimulation mit PMA (10 ng/ml) und Ionomycin (1 μg/ml) kultiviert. Anschließend wurde der IFN-γ-Gehalt in den Überständen per ELISA quantifiziert (**Abb. 9**). Pralnacasan unterdrückte die IFN-γ-Synthese in den Splenozyten sämtlicher Mäuse, die der Substanz ausgesetzt waren. Nur die Placebo-behandelte Gruppe zeigte einen substantiellen Anstieg der IFN-γ-Produktion nach Stimulation mit PMA und Ionomycin (5721 ± 1506 pg/ml; n = 7). Die Differenz in der IFN-γ-Produktion zwischen der Cremophor EL- und allen Pralnacasan-behandelten Gruppen war statistisch signifikant: 12,5 mg/kg bid Pralnacasan p.o. 689 ± 84 pg/ml, n = 5, p = 0,006; 50 mg/kg bid Pralnacasan p.o. 1172 ± 110 pg/ml, n = 8, p = 0,007; 50 mg/kg bid Pralnacasan i.p. 778 ± 175 pg/ml, n = 8, p = 0,004.

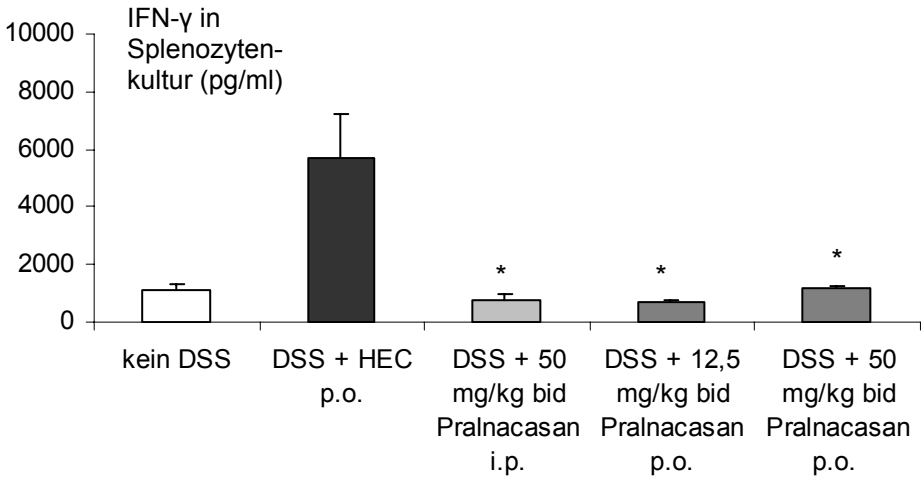


Abbildung 9: IFN-γ im Überstand von Splenozytenkultur. Deutlich zeigte sich, dass Pralnacasan die IFN-γ-Produktion von Splenozyten supprimierte und den Anstieg der IFN-γ-Spiegel nach DSS-Gabe verhinderte.

3.1.6 Pralnacasan im therapeutischen Modell

Nachdem Pralnacasan im präventiven Modell gute Wirksamkeit bewiesen hatte, wurde in einer weiteren Versuchsreihe untersucht, ob die Substanz auch in der Lage ist, eine bereits etablierte Kolitis zu lindern. Zwanzig Balb/c Mäusen wurde über acht Tage 3,5% DSS verabreicht; zwei Mäuse erhielten als Kontrollen kein DSS. Am Abend der siebten Tages wurden die Mäuse gemäß ihres klinischen Scores in zwei Gruppen identischer Kolitisaktivität eingeteilt; die DSS-Gabe wurde über Nacht fortgeführt. Am Morgen des achten Tages wurde DSS abgesetzt, der klinische Score erhoben und mit der zweimal täglichen Gabe von 50 mg/kg Pralnacasan i.p. begonnen. Der Morgen des achten Tages wird im Folgenden als erster Tag der Pralnacasangabe bezeichnet. Täglich wurde nun der klinische Score bestimmt (**Abb. 10**). Es zeigte sich, dass die Gabe von Pralnacasan bereits nach 24 Stunden zu einer leichten Verbesserung der Kolitisaktivität geführt hatte, wohingegen Mäuse der Placebogruppe, die lediglich mit Cremophor EL behandelt wurden, eine Verschlechterung der Symptomatik zeigten (Score von 2,57 ± 0,25 in der Placebogruppe gegenüber 2,07 ± 0,22 in der Pralnacasangruppe). In der Folgezeit verbesserten sich auch die Mäuse der Placebogruppe auf einen Score von zuletzt 1,75 ± 0,36. Die Mäuse der Placebogruppe hielten in dieser Zeit einen Abstand von 0,5 bis 0,7 Scorepunkten. Das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht. Zu Beginn des dreizehnten Versuchstages wurde das Experiment beendet.

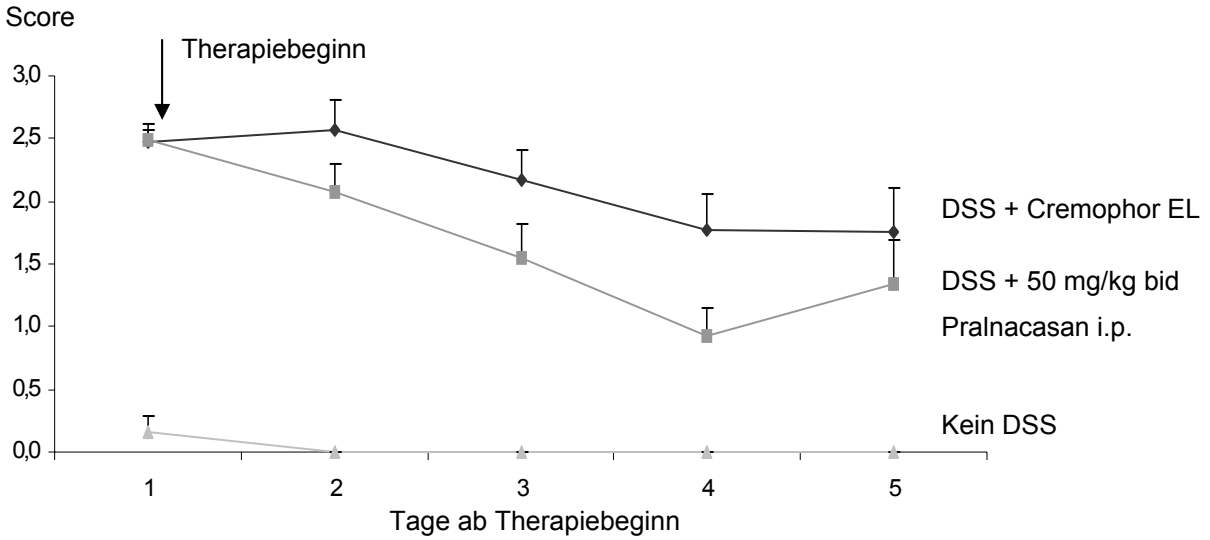


Abbildung 10: Klinischer Score im therapeutischen Modell. Die Gabe von Pralnacasan konnte die Heilung leicht beschleunigen. Die Wirkung des ICE-Inhibitors war jedoch nicht statistisch signifikant fassbar.

3.2 Pralnacasan bewirkt die Reduktion einer IL-18-vermittelten Th1-Immunantwort im Modell der DSS-induzierten Kolitis

3.2.1 Die Linderung der DSS-induzierten Kolitis durch Pralnacasan ist mit reduzierten IL-18-Spiegeln verbunden

Im Unterschied zu den Untersuchungen des vorangehenden Kapitels sollte Pralnacasan nun als Instrument zur Klärung der Pathophysiologie des DSS-Modells verwendet werden. Zu diesem Zweck wurden die Spiegel proinflammatorischer Zytokine im zeitlichen Verlauf untersucht. Weibliche Balb/c Mäuse, die über einen genetischen Hintergrund verfügen, der sie für Th2 Immunantworten prädestiniert, erhielten 3,5% DSS über eine Maximaldauer von elf Tagen. Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt. Zehn Mäuse erhielten 3,5% DSS und Cremophor EL ("Placebo"), 9 Mäuse 3,5% DSS und 50 mg/kg bid Pralnacasan i.p. und 8 Mäuse erhielten als Kontrollgruppe lediglich Wasser sowie Cremophor EL. Vor Versuchsbeginn wurden Subgruppen definiert und für diese der Versuch an den Tagen vier, acht und elf nach Beginn der DSS-Gabe beendet. Den jeweiligen Tieren wurde Gewebe für die *ex vivo* Untersuchungen entnommen. Die Verabreichung von DSS führte zur Ausbildung einer kolitischen Symptomatik, die sich ab dem dritten Versuchstag entwickelte. Pralnacasangabe verringerte den klinischen Score signifikant (**Abb. 11**). Nach elf Tagen hatten die Tiere in der Placebogruppe einen klinischen Score von 2,00 ± 0,26 erreicht. Mäuse in der Pralnacasangruppe hielten sich bei einem Score von 0,56 ± 0,24 ($p = 0,021$). Mäuse in der Placebogruppe hatten 13 % ihres Ausgangsgewichts verloren, wohingegen

Mäuse in der Pralnacasangruppe nur 8% verloren hatten. Die Reduktion der Darmlänge unter DSS-Gabe (9,80 ± 0,96 cm an Tag 11 der DSS-Gabe verglichen mit 14,25 ± 0,28 cm in der Kontrollgruppe, p = 0,002) wurde durch Pralnacasan verringert (12,33 ± 0,54 cm an Tag 11 der DSS-Gabe, p = 0,136 verglichen mit der Placebogruppe an Tag 11).

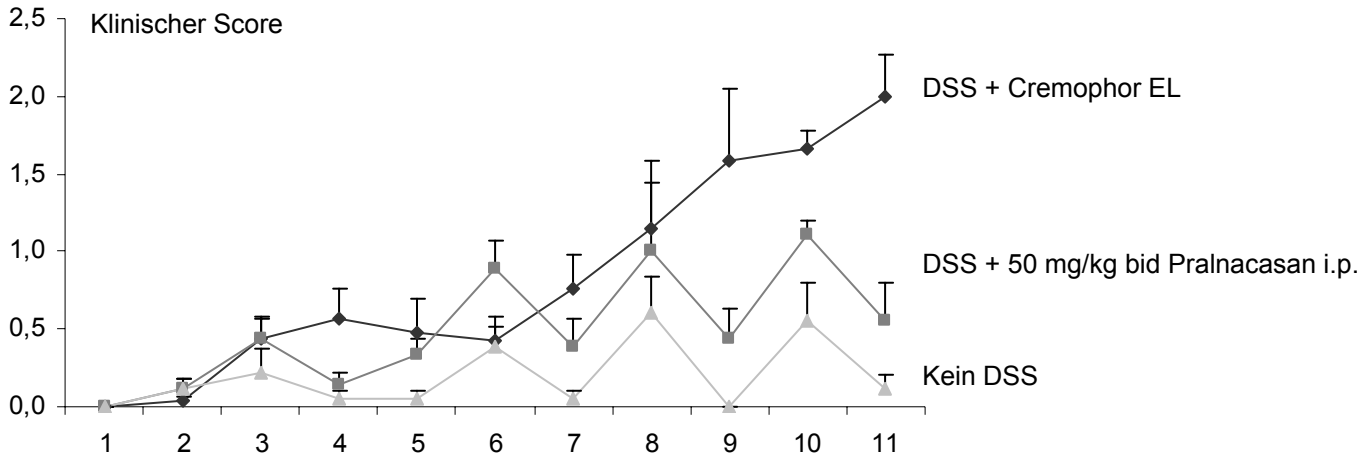


Abbildung 11: Klinischer Score. Mäuse der Pralnacasangruppe verlieren weniger Körpergewicht und zeigen weniger kolitische Symptome als die Versuchstieren in der Gruppe, die lediglich Trägersubstanz erhielt.

Um den Einfluss von Pralnacasan auf die Zytokinexpression zu bestimmen, wurde der Gehalt an TNF-α, IL-18, IFN-γ und IL-12 in Kolonhomogenat per ELISA bestimmt (**Abb. 12**). Nach viertägiger DSS-Gabe waren die IL-18-Spiegel signifikant angestiegen (1977 ± 400 pg/mg Protein verglichen mit 923 ± 136 pg/mg Protein in der Kontrollgruppe ohne DSS, p = 0,009). Pralnacasan verhinderte diesen Anstieg (1076 ± 107 pg/mg Protein, p = 0,049 verglichen mit Placebo). Nach 8 und 11 Tagen der DSS-Gabe fanden sich IL-18-Spiegel von 1046 ± 389 pg/mg Protein und 827 ± 70 pg/mg Protein in der Placebogruppe sowie von 929 $\pm$ 297 pg/mg Protein und 1190 $\pm$ 211 pg/mg Protein in der Pralnacasan-behandelten Gruppe.

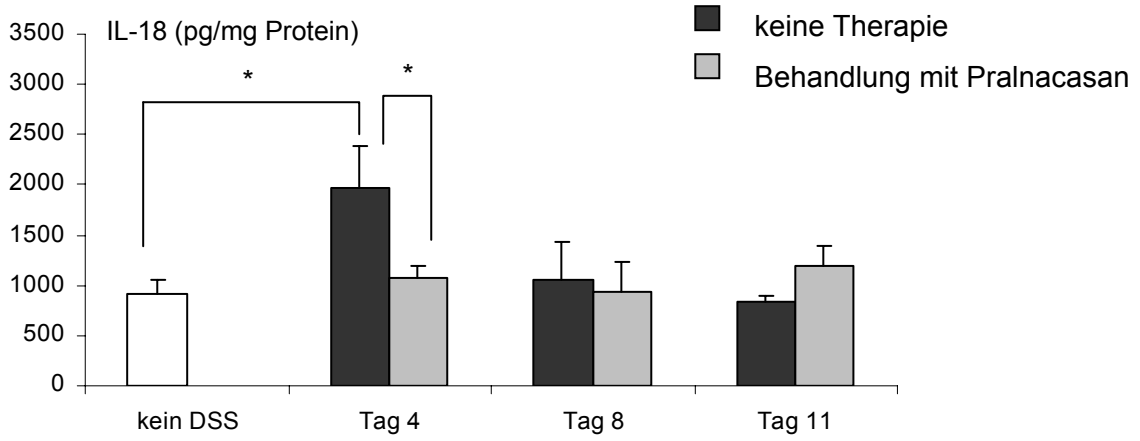


Abbildung 12: Die Produktion von IL-18 steigt schon wenige Tage nach Beginn der DSS-Gabe steil an. Im Vergleich zur Kontrollgruppe fand sich signifikant mehr IL-18-Protein im Kolonhomogenat der Placebogruppe vier Tage nach Beginn der DSS-Gabe. Dunkle Balken repräsentieren – auch im Folgenden – die Placebogruppen, hellere Balken die Gruppen, die mit Pralnacasan behandelt wurden.

In ähnlicher Weise fanden sich die höchsten Spiegel an TNF-α in der Placebogruppe, die am vierten Tag der DSS-Gabe geopfert wurde (89 ± 40 pg/mg Protein verglichen mit 35 ± 5 pg/mg Protein in der Kontrollgruppe, p = 0,050). Im Gegensatz zur ausgeprägten Wirkung auf die IL-18-Spiegel, hatte Pralnacasan keinen Einfluss auf die TNF-α-Spiegel am vierten Tag (98 ± 36 pg/mg Protein, p = 0,018 verglichen mit der Kontrollgruppe). Acht Tage nach Beginn des Behandlungsprotokolls, fanden sich in der Placebogruppe ein TNF-α-Gehalt von 71 ± 27 pg/mg Protein. Nach elf Tagen wurden 23 ± 7 pg/mg Protein gemessen.

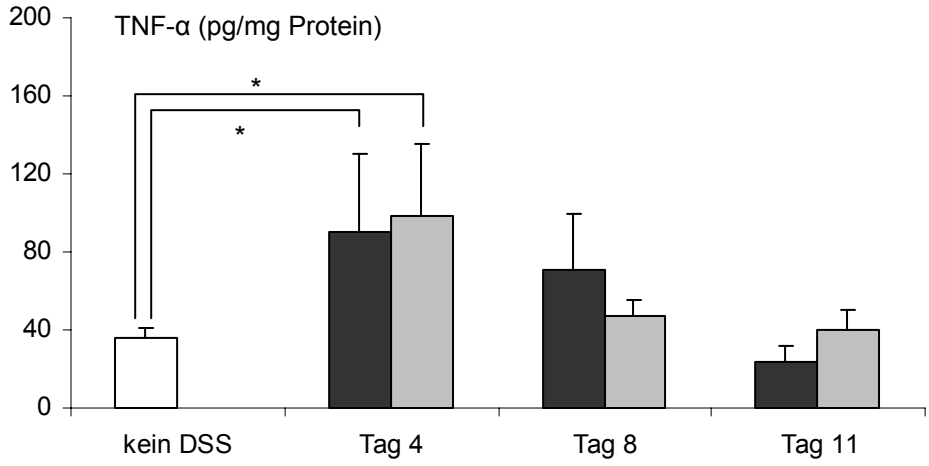


Abbildung 13: Auch die TNF-α-Menge stieg zu Beginn der DSS-Gabe steil an. Im Gegensatz zu IL-18 fanden sich auch in der Pralnacasangruppe am vierten Versuchstag erhöhte TNF-α-Spiegel (dunkle Balken = Placebogruppe, hellere Balken = Pralnacasangruppe)

IL-12 zeigte denselben Zytokingipfel am vierten Tag der DSS-Gabe (1615 ± 317 pg/mg Protein in der Placebogruppe verglichen mit 418 ± 86 pg/mg Protein in der Kontrollgruppe, $p < 0,001$). Wiederum hatte Pralnacasan nur einen geringen Effekt auf die IL-12-Produktion (1127 ± 394 pg/mg Protein).

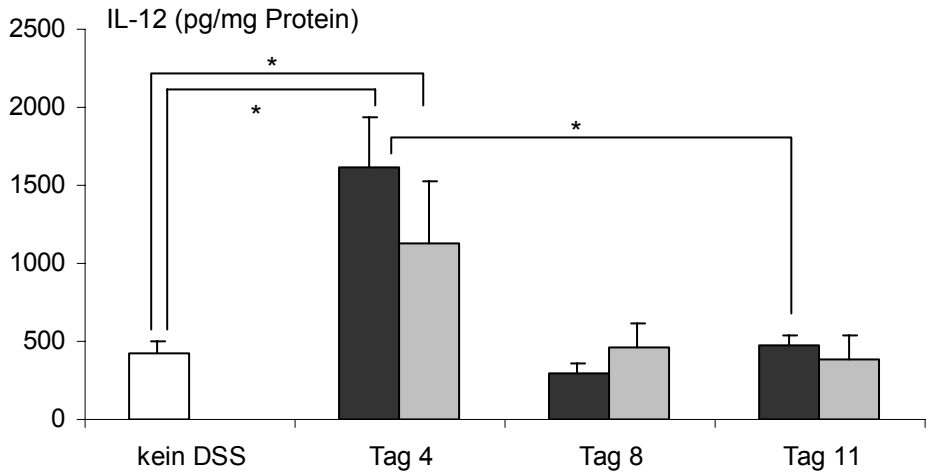


Abbildung 14: IL-12 zeigte ein ähnliches Muster im zeitlichen Verlauf wie TNF-α. Der Abfall der IL-12-Spiegel zum Ende des Versuchs war statistisch signifikant.

Interessanterweise wurde der IFN-γ-Gehalt im Kolon durch die DSS-Gabe – wie schon im Vorversuch – nur gering beeinflusst (302 ± 28 pg/mg Protein in der Kontrollgruppe; 407 ± 128 pg/mg Protein nach vier Tagen; 296 ± 65 pg/mg Protein nach acht Tagen und 220 ± 22 pg/mg Protein nach elf Tagen DSS-Gabe in der Placebogruppe). Behandlung mit Pralnacasan reduzierte den moderaten Anstieg der IFN-γ-Produktion in der frühen Phase der DSS-Gabe.

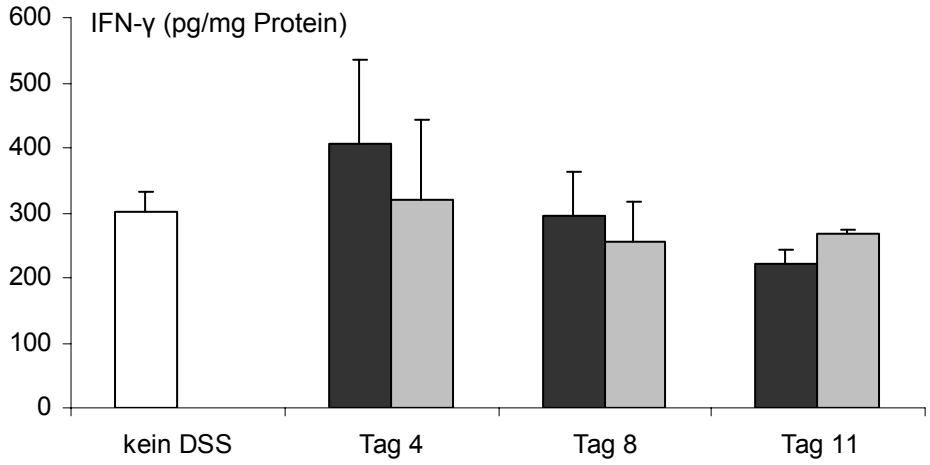


Abbildung 15: Die Produktion von IFN-γ steigt im Darm von Balb/c Mäusen unter DSS-Gabe nicht signifikant an. Auch die Behandlung mit Pralnacasan erbrachte keine Änderung der IFN-γ-Spiegel in Kolonhomogenat.

IL-1β stieg unter DSS-Gabe kontinuierlich bis zum elften Tag der Gabe an und erreichte schließlich nach 122 pg/mg Protein an Tag 4 und 262 pg/mg Protein an Tag 8 einen Wert von 486 pg/mg Protein am elften Tag der DSS-Gabe. In der Kontrollgruppe fanden sich in diesem Experiment 39 pg/mg Protein; die Unterschiede zu den mit DSS behandelten Tieren waren hochsignifikant ($p < 0{,}001$, $p = 0{,}024$ und $p = 0{,}023$). Pralnacasan schien in den ersten Tagen nur geringen Einfluss auf die Menge an IL-1β im Kolonhomogenat zu haben. Im Kolon der Mäuse, für die der Versuch an Tag 11 beendet wurde, fanden sich in der Pralnacasangruppe jedoch deutlich reduzierte IL-1β-Spiegel. Dabei entsprachen die niedrigen IL-1β-Werte den niedrigen Werten dieser Mäuse im klinischen Score.

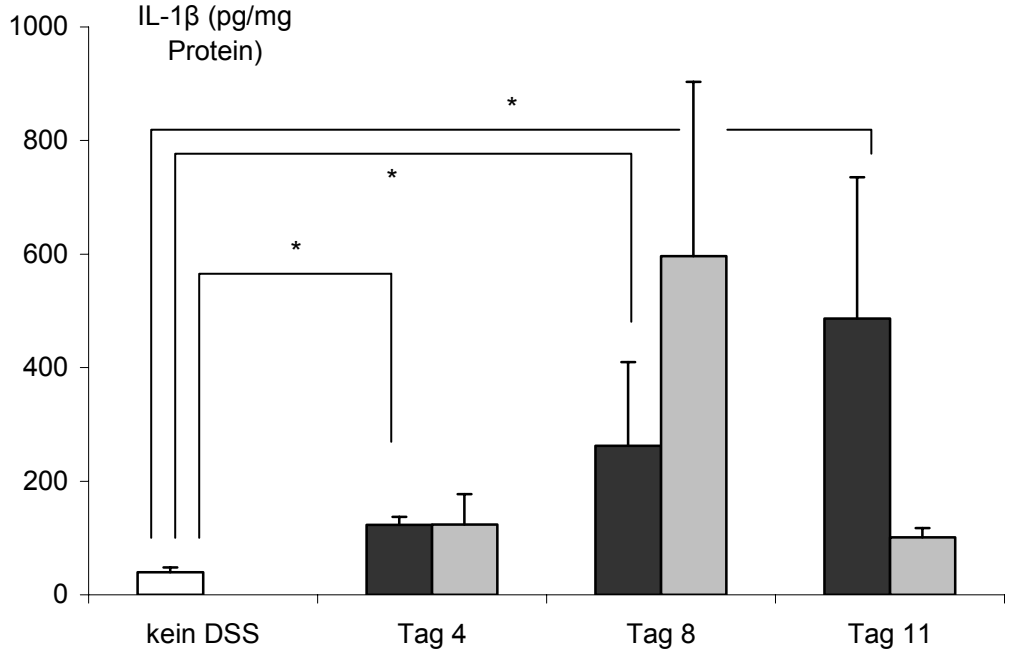


Abbildung 16: IL-1β stieg unter DSS-Gabe signifikant an. Pralnacasan hatte keinen signifikanten Einfluss auf die IL-1β-Spiegel. Es zeigte sich jedoch – wie durch den Mechanismus des ICE-Inhibitors zu erwarten – ein Trend hin zu einer Reduktion der Spiegel durch Pralnacasan im Verlauf des Entzündungsgeschehens.

3.2.2 Pralnacasan reduziert signifikant den Anstieg der IP-10-mRNA-Expression

Verglichen mit der Kontrollgruppe (77 ± 25 TNF-α-mRNA-Kopien pro eine Million GAPDH-Kopien), führte DSS-Gabe bei den Balb/c Mäusen zu einer erhöhten Expression an TNF-α-mRNA im zeitlichen Verlauf (76 ± 45 Kopien am vierten Tag, 330 ± 93 Kopien am achten Tag und 258 ± 117 Kopien am elften Tag in der Placebogruppe). Dieser signifikante Anstieg ($p = 0{,}006$ an Tag 8 und $p = 0{,}079$ an Tag 11) wurde durch Behandlung mit Pralnacasan reduziert (jeweils 135 ± 19, 196 ± 86 und 34 ± 7 Kopien).

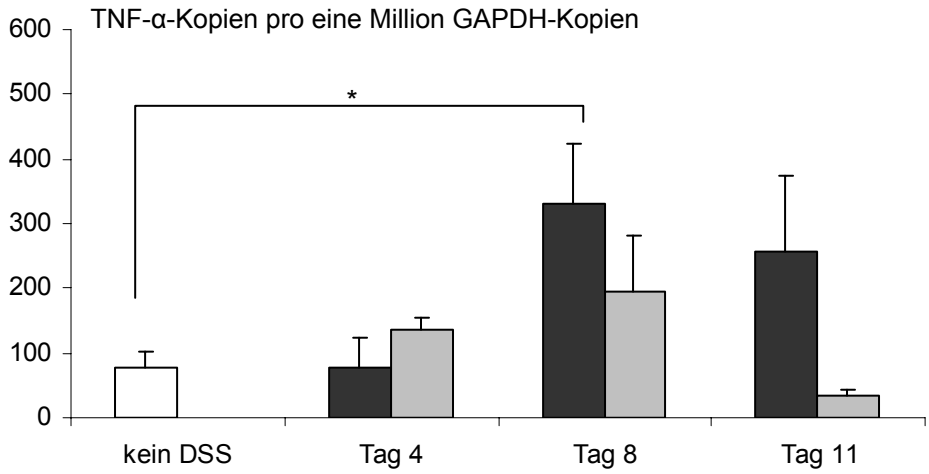


Abbildung 17: Die Anzahl der TNF-α-mRNA-Kopien in Kolongewebe steigt unter DSS-Gabe signifikant an. Pralnacasan reduziert die Anzahl der TNF-α-mRNA-Kopien zwar; der Effekt war jedoch nicht statistisch fassbar. Dunkle Balken repräsentieren die lediglich mit Trägerlösung behandelten Mäuse; die Pralnacasan-behandelten Tiere sind durch hellgraue Balken repräsentiert.

Die Expression von IP-10 mRNA stieg während der DSS-Gabe ebenfalls stetig an. Kontrolltiere zeigten einen Index von 47 ± 20 IP-10-Kopien pro eine Million GAPDH-Kopien. In der Placebo-behandelten Gruppe stieg dieser Indexwert signifikant auf 73 ± 52, 209 ± 88 und 292 ± 123 an den Tagen 4, 8 und 11 der DSS-Gabe an ($p = 0{,}011$ am achten Tag und $p = 0{,}028$ am elften Tag). Pralnacasan konnte diesen Anstieg verhindern (jeweils 129 ± 76, 58 ± 24 and 84 ± 43 Kopien, $p = 0{,}049$ an Tag 8).

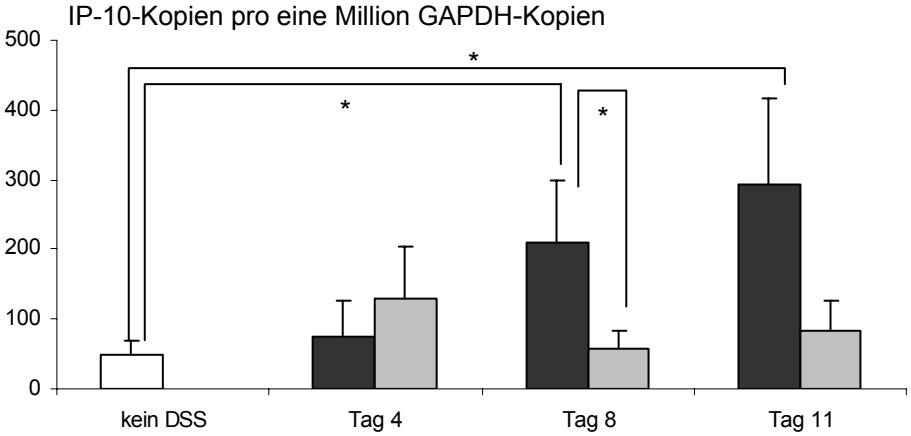


Abbildung 18: Die IP-10-mRNA-Expression stieg wie die Expression von TNF-α zwischen dem vierten und dem achten Tag signifikant an. Deutlicher als im Falle von TNF-α wurde die IP-10-Expression von Pralnacasan supprimiert.

Die DSS-Gabe hatte keinen signifikanten Einfluss auf die IL-18-mRNA-Expression (407 ± 68 Kopien in der Kontrollgruppe, 173 ± 9 Kopien am vierten Tag, 388 ± 123 Kopien am achten Tag und 456 ± 290 Kopien am elften Tag in der Placebogruppe). Interessanterweise war die IL-18-mRNA-Expression in der Pralnacasan-behandelten Gruppe nach elf Tagen DSS-Gabe signifikant erhöht (857 ± 156 Kopien, p = 0,0136).

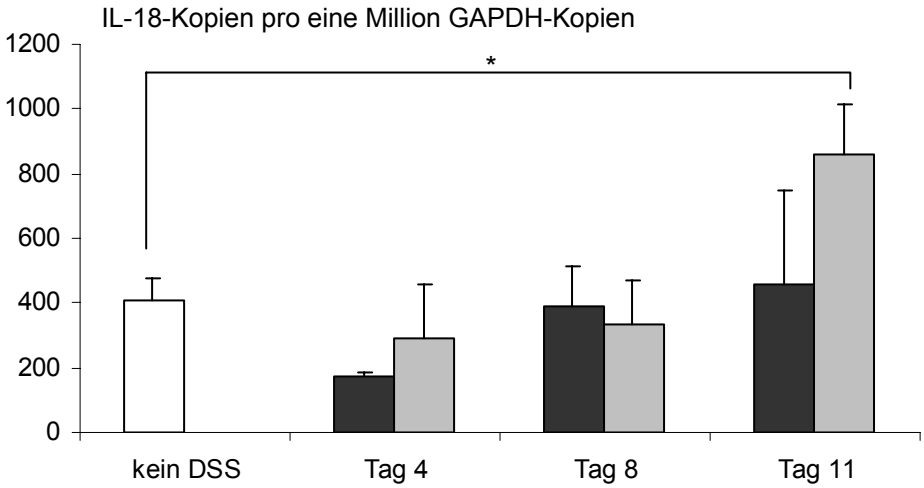


Abbildung 19: In der Placebogruppe ließ sich kein Anstieg der IL-18-mRNA-Expression nachweisen. Lediglich unter Behandlung mit Pralnacasan fand sich nach elftägiger DSS-Gabe eine erhöhte IL-18-Expression.

Kurz zusammengefasst zeigte sich, dass in Balb/c Mäusen die therapeutische Wirksamkeit von Pralnacasan mit einer signifikanten Reduktion der IP-10-mRNA-Expression verbunden war. Da das Interferon-γ-inducible-protein-10 ein direkter Marker für eine Th1-Immunantwort ist, lag es nahe, den Effekt von Pralnacasan in einem Tiermodellsystem zu untersuchen, das Th1-Zell-Aktivierung unterstützt. Als Mausstamm für den folgenden Versuch wurden daher C57BL/6 Mäuse ausgewählt, deren genetischer Hintergrund sie eher in Richtung einer Th1-Immunantwort tendieren lässt.

3.2.3 Pralnacasan besitzt hohe therapeutische Wirksamkeit in C57BL/6 Mäusen und verhindert den IFN-γ-Anstieg unter DSS-Gabe

Zwei Gruppen von C57BL/6 Mäusen (jeweils n = 8) erhielten 1,5% DSS im Trinkwasser und wurden entweder mit 50 mg/kg bid Pralnacasan i.p. oder mit der Trägerlösung 25% Cremophor EL behandelt. Eine Kontrollgruppe von acht Mäusen erhielt Leitungswasser. Vor Versuchsbeginn definierte Subgruppen (jeweils n = 4) wurden am sechsten Tag der DSS-Gabe geopfert; bei den überlebenden Tieren wurde der Versuch am elften Tag beendet. Mäuse der Placebogruppe begannen am sechsten Tag des Versuchs starke kolitische Symptome zu entwickeln. Am Ende des Versuchsprotokolls erreichten die Mäuse, die

lediglich Cremophor EL erhalten hatten, einen klinischen Score von 3,17 ± 0,19. Die mit Pralnacasan behandelte Gruppe zeigte einen klinischen Score von 1,17 ± 0,45. Bis zum neunten Tag der DSS-Gabe waren die Pralnacasan-behandelten Mäuse annähernd symptomfrei und zeigten weder Gewichtsverlust noch Diarrhoe oder positiven Hämoccult (**Abb. 20**). Zusammenschauend betrachtet war Pralnacasan in den C57BL/6 Mäusen wirksamer als in den Balb/c Mäusen.

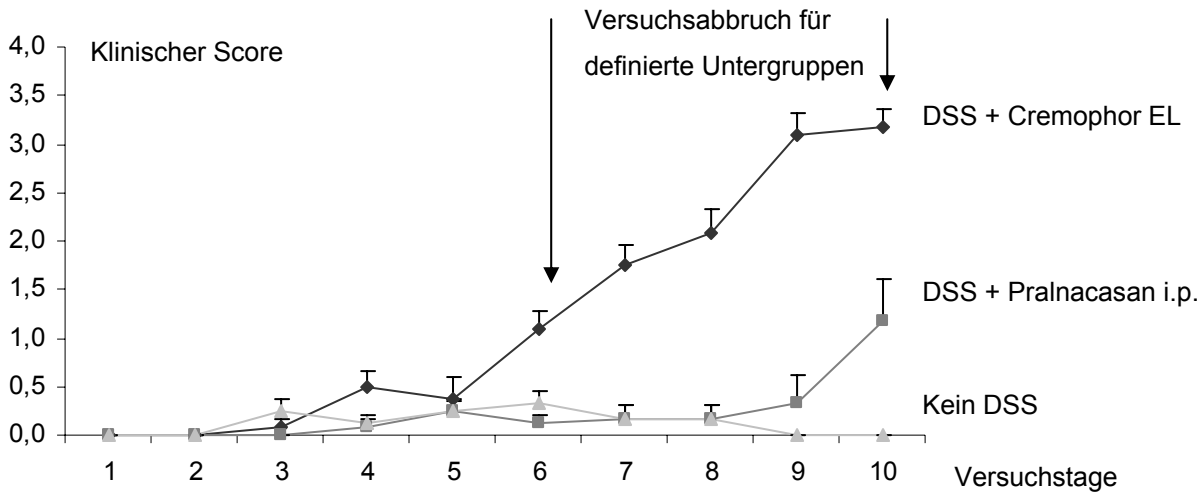


Abbildung 20: Klinischer Score. Auch C57BL/6 Mäuse profitieren von der Behandlung mit 50 mg/kg bid Pralnacasan. Deutlicher noch als bei Balb/c Mäusen zeigte sich der klinische Effekt des ICE-Inhibitors.

Ex vivo wurde der IFN-γ-Gehalt im Kolon bestimmt, um das Maß der Th1-Antwort in C57BL/6 Mäusen nach DSS-Gabe sowie den Einfluss von Pralnacasan zu bestimmen. Im Gegensatz zu Balb/c Mäusen zeigten C57BL/6 Mäuse der Placebogruppe einen signifikanten Anstieg des IFN-γ-Spiegels nach sechstägiger DSS-Gabe (134 ± 18 pg/mg Protein verglichen mit 52 ± 4 pg/mg Protein in der Kontrollgruppe, p = 0,009). Wie in **Abb. 21** dargestellt, verhinderte Pralnacasan den IFN-γ-Anstieg unter DSS-Gabe (97 ± 10 pg/mg, p = 0,016). Am Ende des Versuchsprotokolls war der IFN-γ-Gehalt in Kolonhomogenat (im Vergleich zu den erhöhten Spiegeln an Tag 6) signifikant reduziert (61 ± 5 pg/mg Protein in der Placebogruppe, p = 0,008 verglichen mit dem Gehalt an Tag 6 in der Placebogruppe).

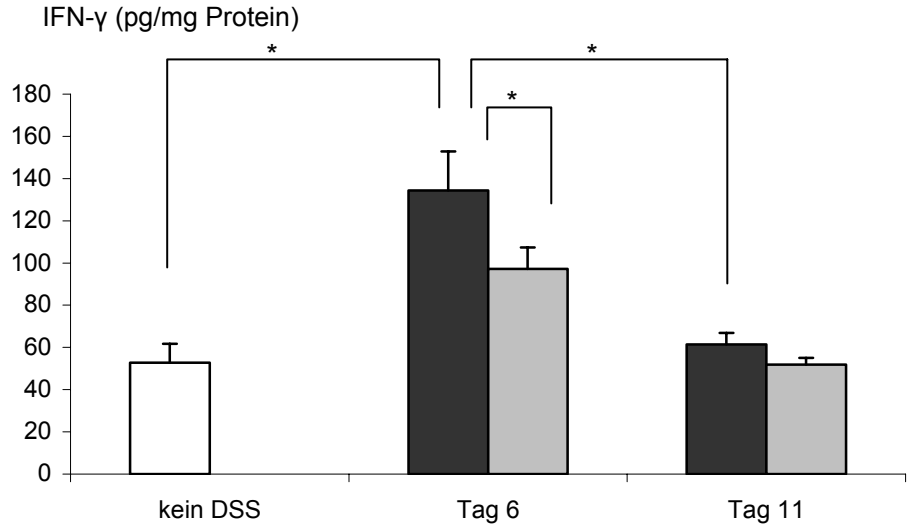


Abbildung 21: C57BL/6 Mäuse reagierten auf die DSS-Gabe mit erhöhten IFN-γ-Spiegeln. Pralnacasan reduzierte die Menge an IFN-γ statistisch signifikant. Nach elftägiger DSS-Gabe fanden sich wiederum IFN-γ-Spiegel auf Höhe des Ausgangswertes (dunkle Balken repräsentieren die Placebogruppe, hellere Balken die Pralnacasangruppe).

3.2.4 Der Anstieg der IP-10-mRNA-, nicht aber der TNF-α-mRNA-Expression unter DSS-Gabe wird in C57BL/6 Mäusen durch Pralnacasan unterbunden

Die Bestimmung der TNF-α-mRNA-Expression durch *Real-time*-PCR zeigte ein Verhältnis von 141 ± 14 TNF-α-Kopien pro eine Million GAPDH-Kopien in der Placebogruppe am elften Versuchstag (**Abb. 22**). Dies entspricht einem hoch signifikanten Anstieg ($P < 0,0001$) verglichen mit den 22 ± 1 Kopien am sechsten Tag und den 9 ± 3 Kopien in der Kontrollgruppe. In C57BL/6 hatte Pralnacasan keinen Einfluss auf die TNF-α-mRNA-Expression (11 ± 6 pg/mg am sechsten Tag und 202 ± 72 pg/mg am elften Tag). Im Gegensatz zur TNF-α-mRNA-Expression waren die Spiegel an IP-10-mRNA durch Pralnacasangabe signifikant beeinflusst. Die IP-10-mRNA-Expression zeigte einen stetigen Anstieg unter DSS-Gabe. Es fanden sich 80 ± 31 Kopien pro eine Million GAPDH-Kopien in der Kontrollgruppe verglichen mit 241 ± 29 Kopien am sechsten Tag ($p < 0,0001$) und 761 ± 83 Kopien am elften Tag ($p < 0,0001$) in der Placebogruppe. Pralnacasan verhinderte diesen Anstieg (57 ± 15 Kopien an Tag 6, $p = 0,0306$, und 187 ± 46 Kopien an Tag 11, $p = 0,0009$). Wie im vorangegangenen Versuch wurden die Spiegel an IL-18-mRNA durch die Gabe von DSS nicht signifikant beeinflusst. Verglichen mit der Expression von IL-18 in Balb/c Mäusen war die Anzahl der IL-18-Kopien im Kolon von C57BL/6 Mäusen sehr hoch: Es fanden sich 8472 ± 858 Kopien pro eine Million GAPDH-Kopien in der Kontrollgruppe ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

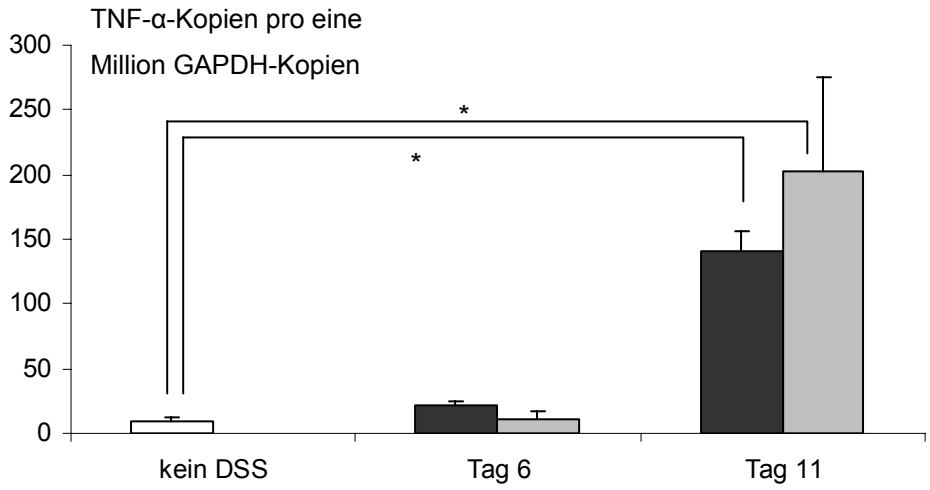


Abbildung 22: Wie auch in Balb/c Mäusen fand sich eine Erhöhung der Anzahl an TNF-α-Kopien nach dem sechsten Tag der DSS-Gabe. Pralnacasan (hellgraue Balken) hatte auf die Expression von TNF-α keinen Effekt.

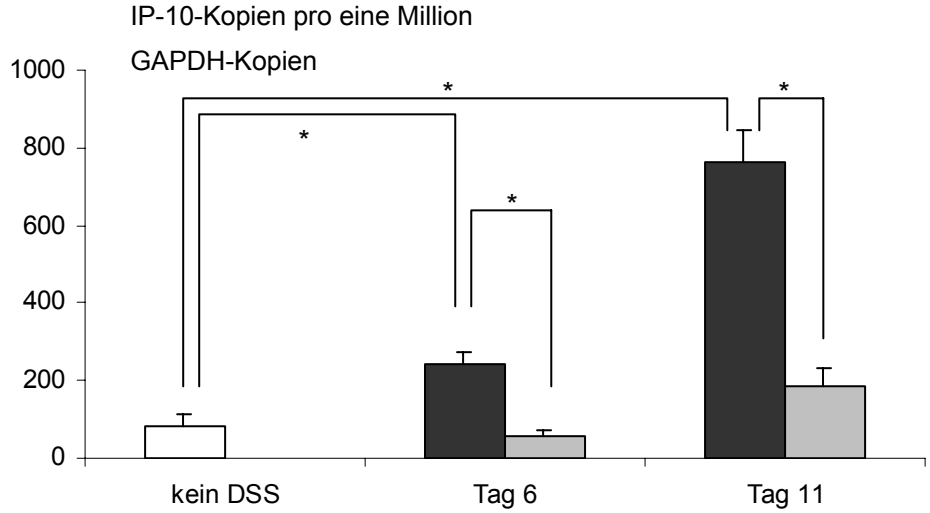


Abbildung 23: Die Anzahl der IP-10-Kopien stieg unter DSS-Gabe stetig an. Anders als bei der TNF-α-Expression wurde die Expression des Interferon-γ-inducing-protein-10 durch den ICE-Inhibitor signifikant supprimiert.

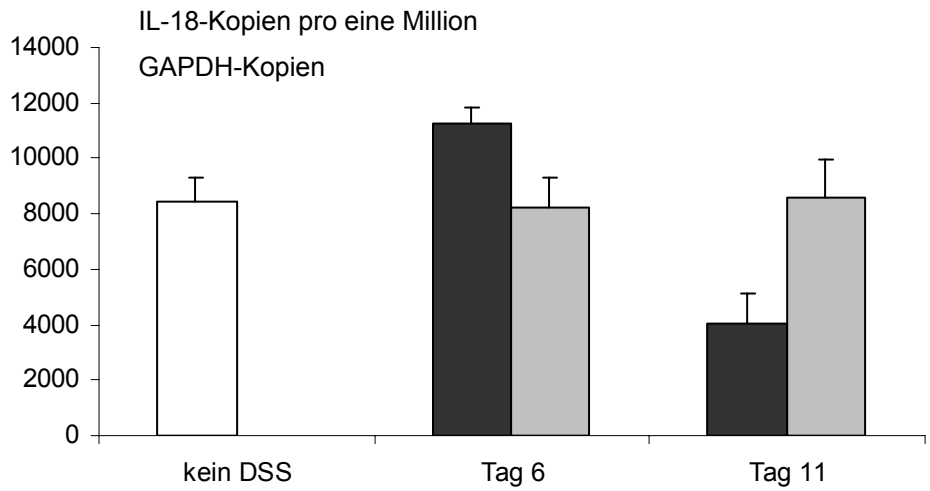


Abbildung 24: Die Anzahl der IL-18-Kopien wurde weder durch die Applikation von DSS noch durch den ICE-Inhibitor signifikant beeinflusst.

3.2.5 Schädigung des Epithels durch DSS-Gabe

In der histologischen Analyse wurde ein separater Entzündungs- und Epithelschadensscore ermittelt. Es fanden sich keine Zeichen von Epithelschaden in der Kontrollgruppe und nach viertägiger DSS-Gabe. Nach acht und elf Tagen DSS-Gabe jedoch war das Kolonepithel stark geschädigt. Es fand sich ein Score von 1,33 $\pm$ 0,62 am achten Tag und 1,25 $\pm$ 0,41 am elften Tag in der Placebogruppe, sowie Werte von 1,67 $\pm$ 0,68 und 0,33 $\pm$ 0,27 in der Pralnacasan-behandelten Gruppe. Die Differenz zwischen der Kontrollgruppe und der DSS-Placebogruppe verfehlte das Signifikanzniveau an Tag 8 ($p = 0,054$), erreichte an Tag 11 jedoch einen p-Wert von 0,010. Interessanterweise erreichte der separate Entzündungsscore den Maximalwert acht Tage nach Beginn der DSS-Gabe und fiel anschließend auf 68% des Höchstwertes ab: 0,17 $\pm$ 0,14 am vierten Tag, 1,67 $\pm$ 0,42 am achten Tag und 1,13 $\pm$ 0,37 am elften Tag verglichen mit 0,00 $\pm$ 0,00 in der Kontrollgruppe ($p = 0,003$ an Tag 8 und $p = 0,010$ an Tag 11).

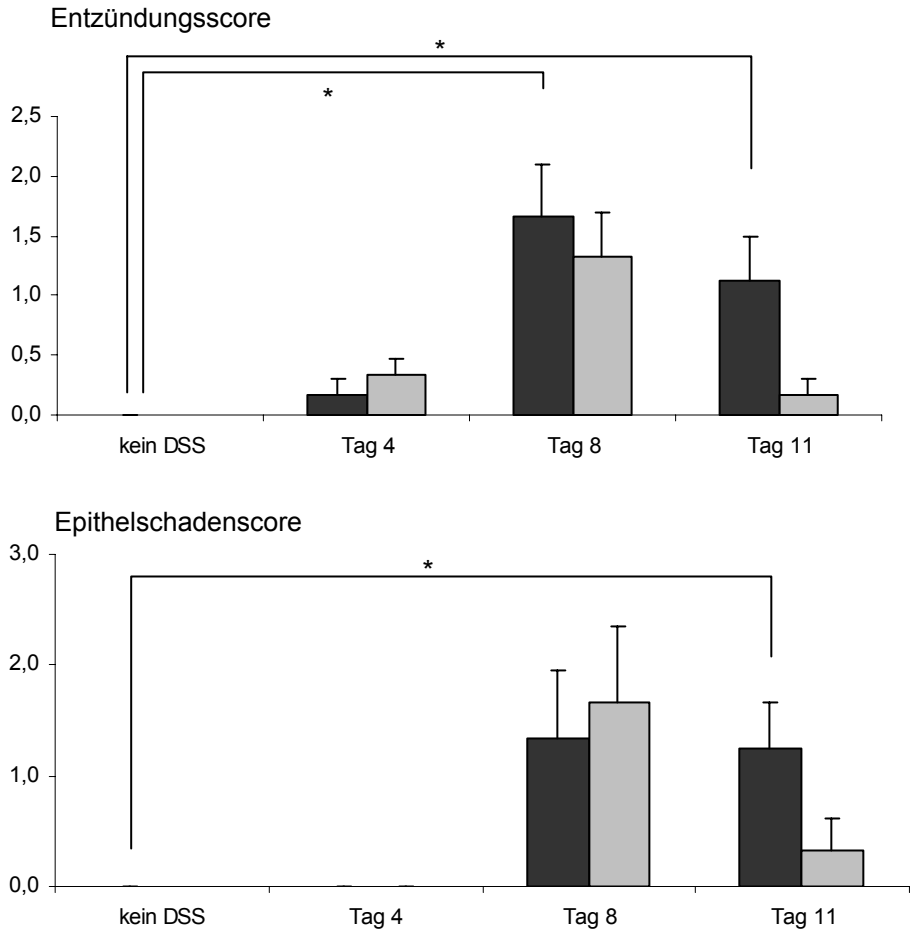


Abbildung 25: Entzündungs- und Epithelschadensscore. Der Effekt von Pralnacasan (hellgraue Balken) am Ende des Versuchs war deutlich, erreichte jedoch in der statistischen Auswertung keine Signifikanz. Am vierten Tag waren die histologischen Parameter noch völlig normal; zu diesem Zeitpunkt fanden sich jedoch schon signifikant erhöhte Werte an IL-18, IL-12 und TNF-α.

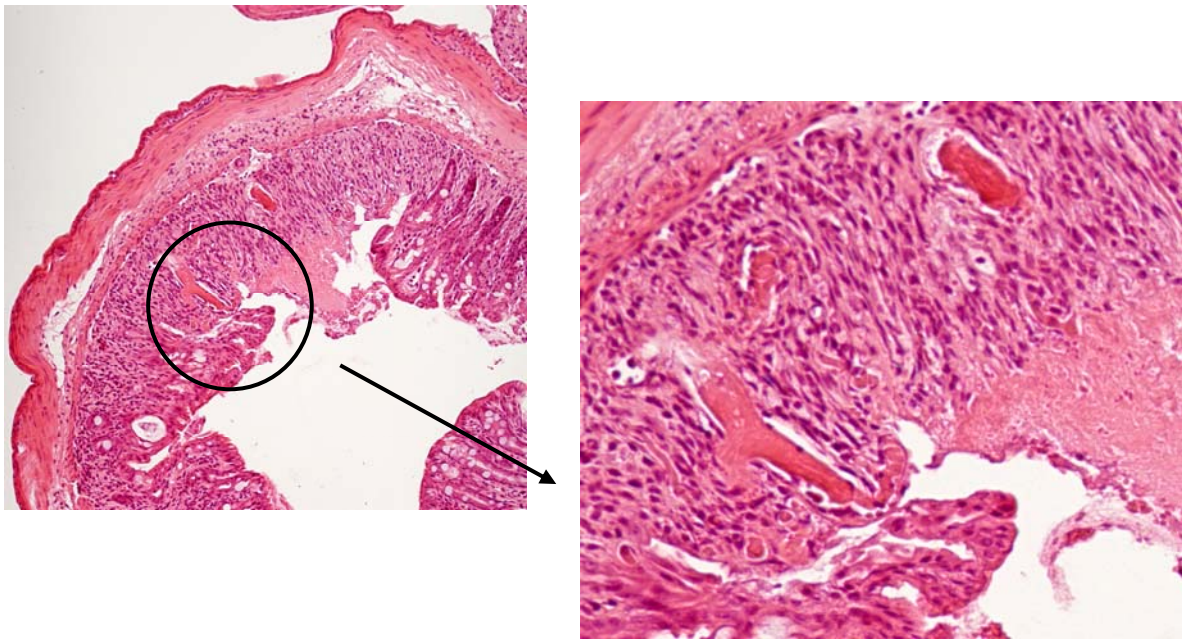


Abbildung 26: Transversalschnitt des Darms einer Maus nach elf Tagen DSS-Gabe ohne Pralnacasanbehandlung (Färbung mit Hämatoxylin-Eosin). Das Gewebe ist fast völlig zerstört: Krypten sind kaum mehr zu erkennen. Entzündungszellen haben ein dichtes Infiltrat gebildet und das Gewebe ist ödematös verquollen und fibrosiert.

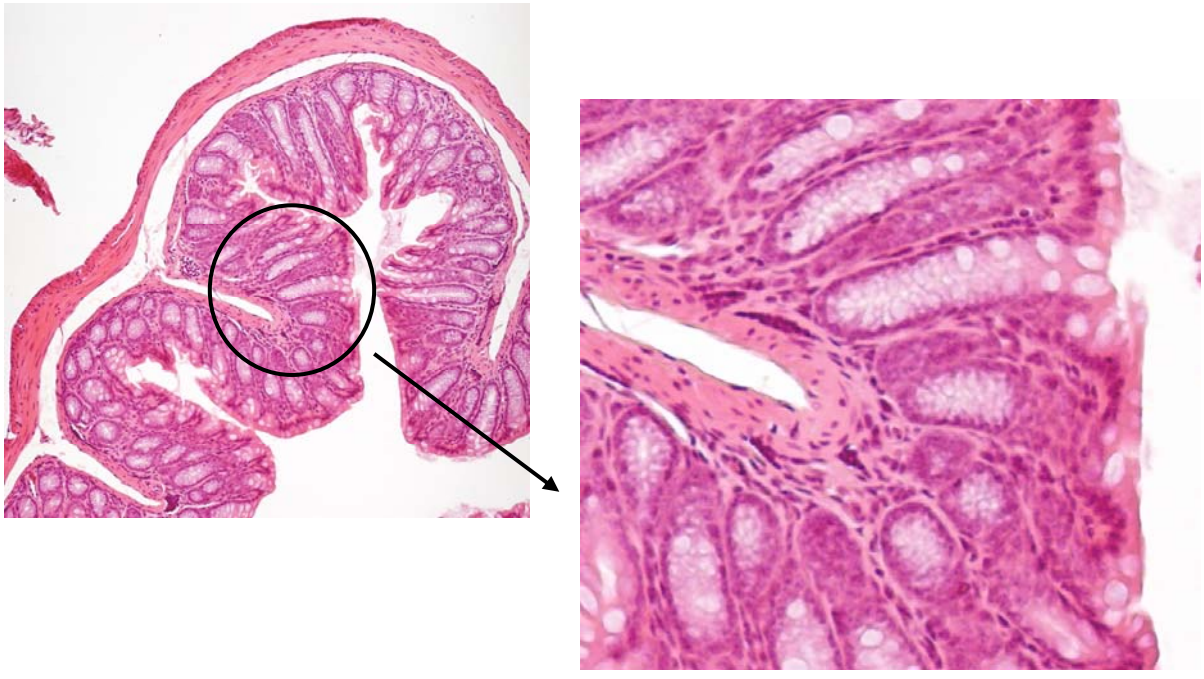


Abbildung 27: Kolongewebe einer Maus nachelftägiger DSS-Gabe mit begleitender Pralnacasantherapie. Deutlich ist zu erkennen, dass die Struktur der Krypten erhalten und die Epithelbarriere im Unterschied zu den Placebomäusen unbeschadet ist. Es sind kaum infiltrierende Zellen auszumachen. Die Ödembildung und die Fibrosierung sind gering ausgeprägt.

3.3 Untersuchung alternativer Parameter der Kolitisaktivität in der Spätphase der DSS-induzierten Kolitis

3.3.1 TNF-α-, MCP-1- und KC-mRNA-Expression

Die nachweisbare Menge an proinflammatorischem Protein korreliert in der Spätphase der DSS-induzierten Kolitis nicht in allen Fällen mit dem klinischen Schweregrad der Entzündung. Proteinmessungen scheinen somit ein wenig valider Parameter der Kolitisaktivität zu sein. Es wurden daher Surrogatparameter gesucht, die Aufschluss über die Kolitisaktivität geben können. Die IP-10-mRNA-Expression war bereits in der Frühphase der DSS-Gabe signifikant erhöht – also noch bevor die Tiere eine ausgeprägte klinische Kolitissymptomatik zeigten. Die TNF-α-mRNA-Expression jedoch stieg – gerade in C57BL/6 Mäusen – erst zum elften Tag der DSS-Gabe an. Somit könnte gerade die TNF-α-mRNA-Expression ein geeigneter Parameter der Kolitisaktivität sein und sich als Endpunkt in Tiermodellen chronisch entzündlicher Darmerkrankung eignen.

Unter Verwendung konventioneller PCR wurde vorerst versucht, die Ergebnisse der Light Cycler-PCR aus der zuvor beschriebenen Versuchsreihe mit C57BL/6 Mäusen zu bestätigen, um anschließend weitere Zytokine auf ihre Eignung als Endpunkte des DSS-Modells zu testen. Des weiteren wurde untersucht, ob die mRNA-Expression in Lymphknoten als geeigneter Parameter der DSS-induzierten Kolitis dienen kann. Auch hier lag der Schwerpunkt der Arbeit auf der Untersuchung des zeitlichen Verlaufs. Zuletzt beschäftigt sich dieses Kapitel auch mit der Frage, inwieweit die durchflusszytometrische Analyse paraaortaler Lymphknotenzellen ein geeigneter Parameter der Kolitisaktivität ist.

Unter Verwendung konventioneller PCR wurde die Menge an TNF-α-mRNA als optische Dichte (OD) der TNF-α-Bande per optischer Dichte der β-Aktin-Bande berechnet, wodurch sich Indexwerte der relativen Expression ergaben. Zum Einsatz kamen dabei die Kolongewebsproben aus dem Pralnacasanversuch mit C57BL/6 Mäusen. Vorrangig sollten die Ergebnisse der *Real-time*-PCR reproduziert und visualisiert werden. Die TNF-α-mRNA-Expression war in der Tat am höchsten in den Mäusen, die elf Tage DSS erhalten hatten. Die Indexwerte lagen bei 1,30 ± 0,11 in der Kontrollgruppe und in der unbehandelten DSS-Gruppe bei 0,71 ± 0,08 an Tag 6 und 1,97 ± 0,04 an Tag 11 ($p = 0,012$ im Vergleich zur Kontrollgruppe). Bei den Pralnacasan-behandelten Tieren fand sich ein Indexwert von 0,931 ± 0,071 am sechsten Tag und von 2,044 ± 0,139 am elften Tag. Die Behandlung mit Pralnacasan zeigte – wie auch in der *Real-time*-PCR – keinen Effekt auf die TNF-α-mRNA-Expression. Es ist aber festzustellen, dass die einzige Maus in der Pralnacasangruppe, die

auch am elften Tag noch völlig gesund war, eine sehr schwache TNF-α-Bande aufwies. Dies deckte sich vollständig mit den Befunden der *Real-time*-PCR; auch hier hatte diese spezifische Maus am elften Tag der DSS-Gabe den geringsten Relativwert in ihrer Gruppe mit 25 TNF-α-Kopien pro eine Million GAPDH-Kopien bei einem Gruppendurchschnittswert von 202 TNF-α-Kopien pro eine Million GAPDH-Kopien.

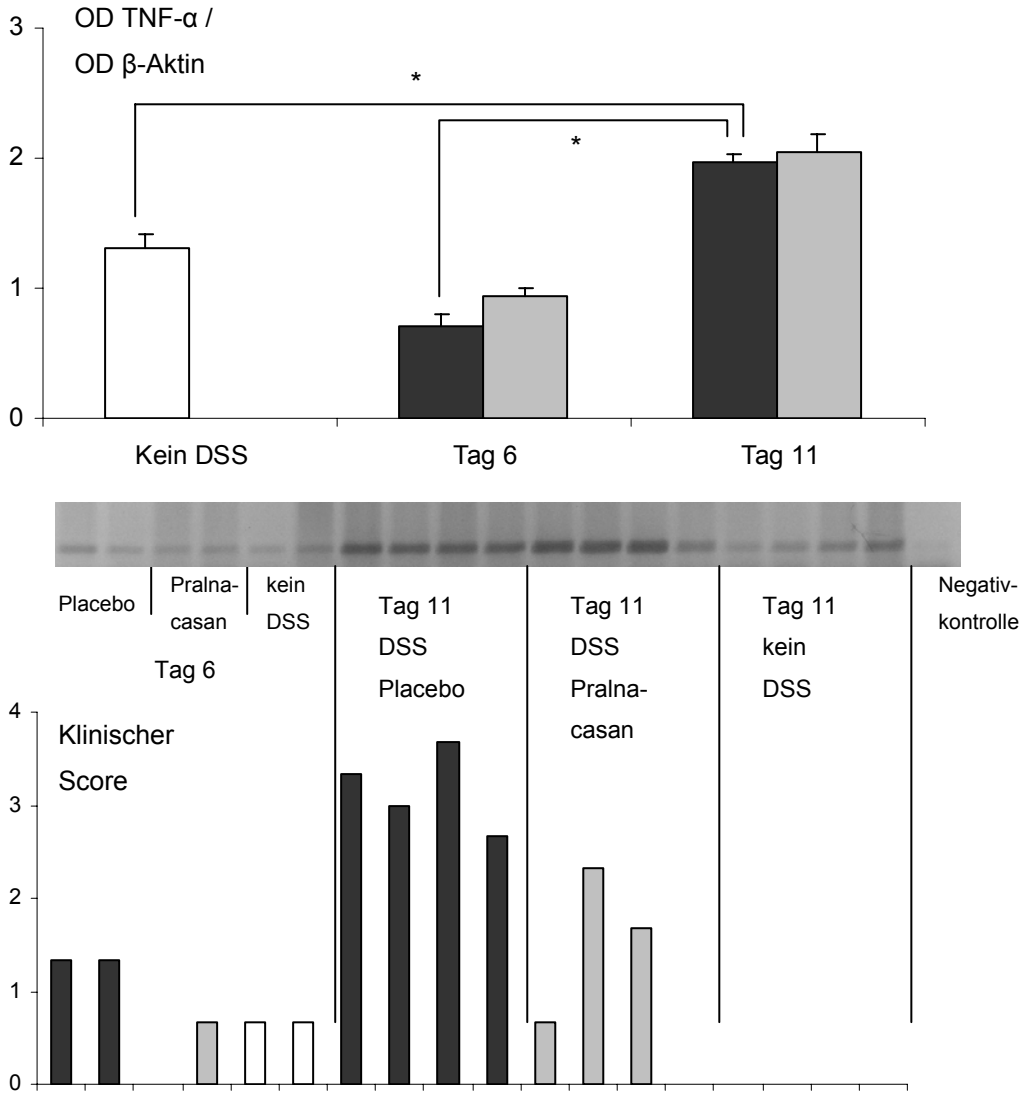


Abbildung 26: TNF-α-mRNA-Expression in Kolongewebe. Die obere Balkengraphik repräsentiert die Mittelwerte der OD TNF-α per OD β-Aktin. Dunkle Balken repräsentieren dabei die Placebogruppe, helle Balken die Pralnacasangruppe. Darunter die Photographie der TNF-α-Banden. Die untere Balkengraphik stellt den klinischen Scorewert der einzelnen Mäuse dar – in Beziehung gesetzt zu den Banden der darüber stehenden Photographie. Jeder Balken repräsentiert ein individuelles Versuchstier mit dem Scorewert am jeweiligen Abschlusstag. Es zeigt sich, dass die Maus, die auch am elften Tag der DSS-Gabe unter Pralnacasan noch völlig symptomfrei war, eine schwache TNF-α Bande aufweist.

Die MCP-1 mRNA-Expression zeigte ein ähnliches Muster wie die TNF-α-Expression (0,84 ± 0,01 an Tag 11 verglichen mit 0,38 ± 0,17 an Tag 6 in der Placebogruppe, p = 0,012). Es ließ sich kein Effekt von Pralnacasan auf die mRNA-Expression dieses Chemokins nachweisen.

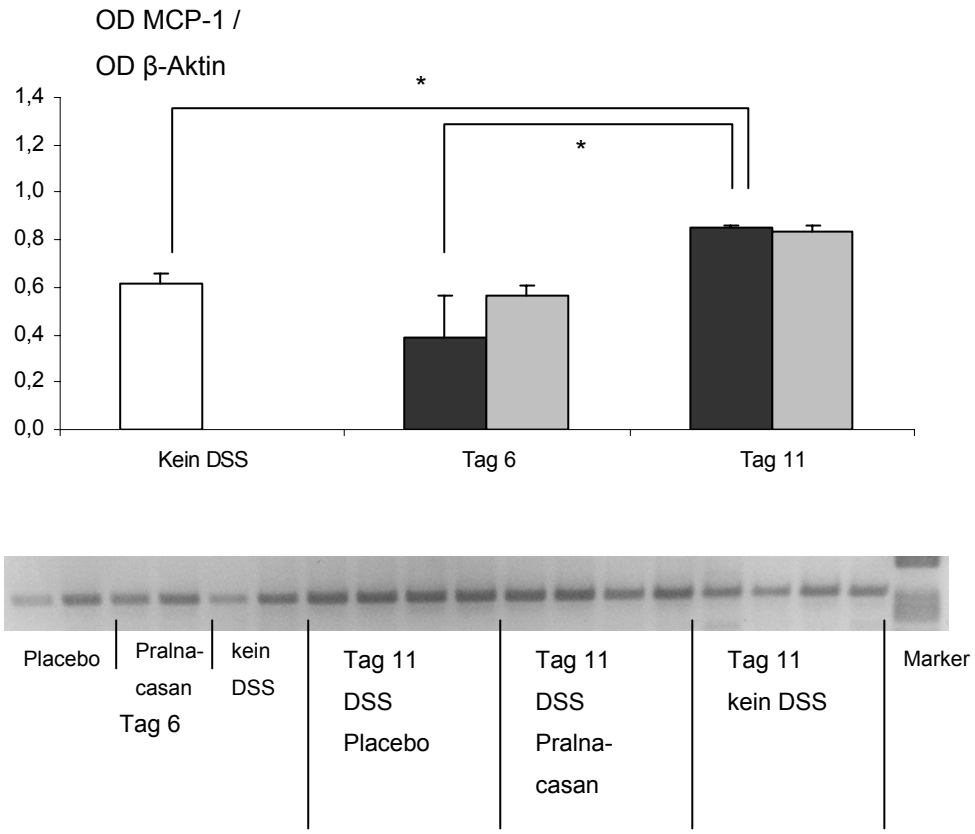


Abbildung 27: MCP-1-mRNA-Expression als OD MCP-1 / OD β-Aktin. Obgleich nominal gering, waren die Differenzen zwischen den Tieren der Kontrollgruppe und den Tieren nach elftägiger DSS-Gabe doch statistisch signifikant. Ein Effekt von Pralnacasan auf die MCP-1-Expression ließ sich nicht nachweisen.

Die Expression von KC wurde durch den ICE-Inhibitor signifikant beeinflusst. Die Kontrolltiere zeigten einen Expressionsindex von 0,05 ± 0,01. Tiere, die DSS erhielten, hatten am sechsten Tag der DSS-Gabe Werte, die noch darunter lagen. Nach elf Tagen wurden erhöhte Werte für die KC-Expression in der Placebogruppe nachgewiesen (0,30 ± 0,05, p < 0,001). Dieser Anstieg war in der Pralnacasan-behandelten Gruppe signifikant reduziert auf einen Indexwert von 0,13 ± 0,02 (p = 0,028).

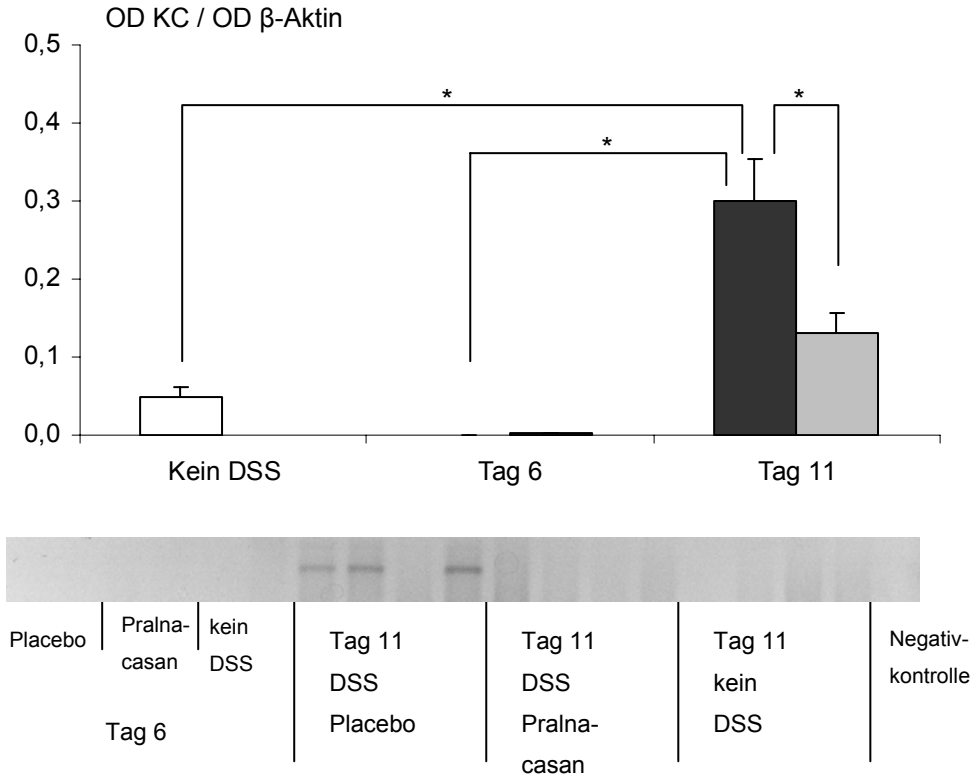


Abbildung 28: KC-mRNA-Expression im Kolongewebe von C57BL/6 Mäusen. Die Reduktion der stark gesteigerten KC-Expression nach elf Tagen DSS-Gabe durch Pralnacasan war statistisch signifikant.

3.3.2 IL-18-, IP-10- und TNF-α-mRNA-Expression in paraaortalen Lymphknoten

Neben der mRNA-Expression in Kolongewebe wurde auch die Expression in Lymphknotengewebe untersucht. Zum Einsatz kam auch für diese Experimente Material des Versuches an C57BL/6 Mäusen. Im Fall von IL-18 waren die Werte der Placebogruppe gegenüber der Pralnacasan- und der Kontrollgruppe zwar erhöht mit 856 Kopien in der Placebogruppe am letzten Tag versus 538 Kopien in der Pralnacasangruppe, sowie 537 Kopien in der Kontrollgruppe (jeweils pro eine Million GAPDH-Kopien). Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht. Die TNF-α-mRNA-Expression in Lymphknotengewebe wurde weder durch die DSS-Gabe noch durch Pralnacasan beeinflusst und lag – sehr niedrig – zwischen 13 und 31 Kopien in den verschiedenen Armen der Analyse. Die IP-10-mRNA-Expression in Lymphknotengewebe war zwar am elften Tag der DSS-Gabe erhöht (von 40 Kopien in der Kontrollgruppe auf 72 Kopien in der Placebogruppe an Tag 11); auch in diesem Fall wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht.

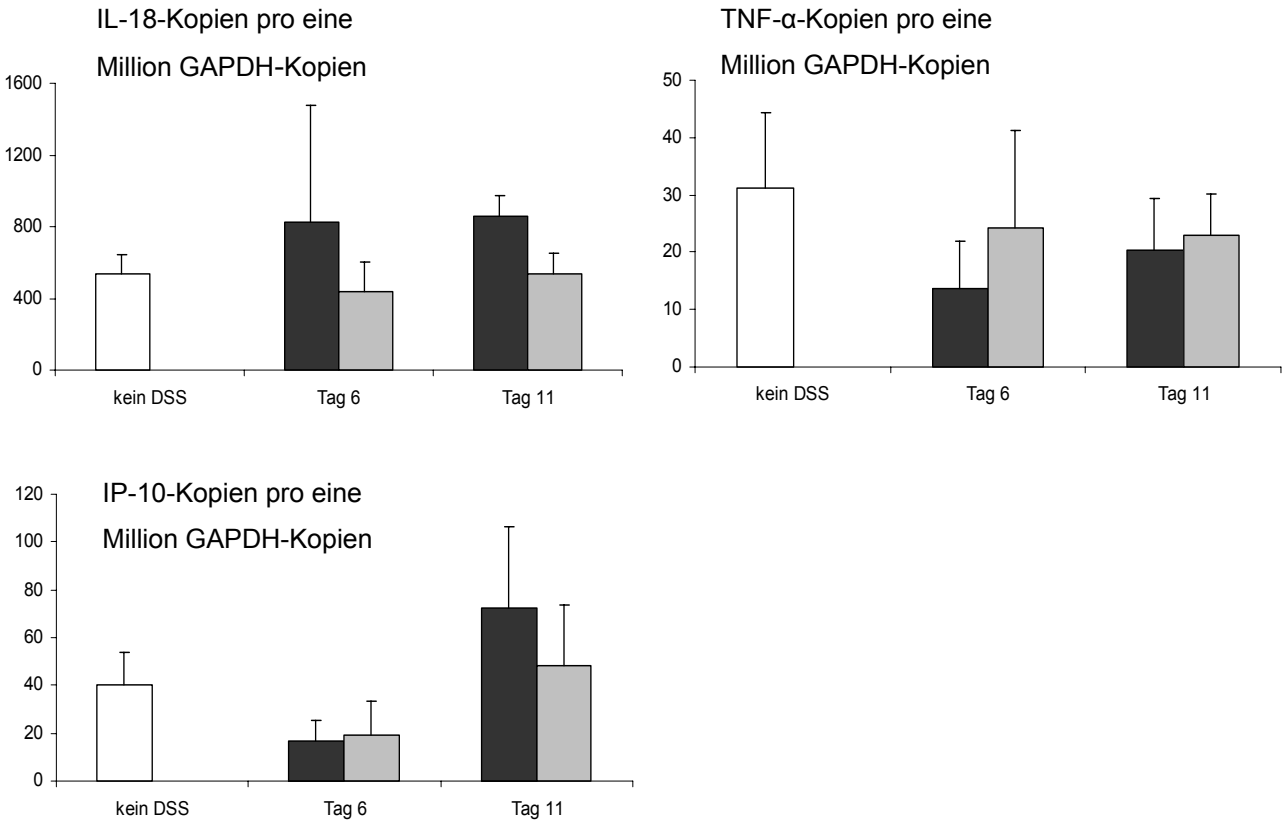


Abbildung 29: Expression von IL-18, TNF-α und IP-10 in Lymphknotengewebe paraortaler Lymphknoten.

Weder die Expression von IL-18, noch von TNF-α oder IP-10 wurde durch die Gabe von DSS signifikant beeinflusst. Dementsprechend fand sich auch kein Effekt des Interleukin-1β converting enzyme Inhibitors Pralnacasan (hellgraue Balken) auf die mRNA-Expression.

3.3.3 IFN-γ-positive Lymphozyten aus paraaortalen Lymphknoten

Als weiterer Parameter des entzündlichen Prozesses in den drainierenden Lymphknoten des Gastrointestinaltraktes wurde intrazelluläres IFN-γ in Lymphozyten aus paraaortalen Lymphknoten nach Stimulation gemessen. Es wurde sowohl Material der C57BL/6 Mäuse als auch Lymphknotenmaterial der Balb/c Mäuse des *time course*-Versuches (vergleiche Gliederungspunkte 3.2.1 bis 3.2.3) verwendet. In C57BL/6 Mäusen fanden sich – bei hohem Ausgangsniveau – keine signifikant erhöhten Spiegel unter DSS-Gabe. In der Kontrollgruppe fanden sich 41,7 ± 6,0% IFN-γ-positive Zellen (n = 8). In der Placebogruppe waren am sechsten Tag 51,3 ± 6,6% der Zellen aus paraaortalen Lymphknoten IFN-γ-positiv, am elften Tag 63,5 ± 2,9% (jeweils n = 3). In der Pralnacasangruppe lagen die entsprechenden Werte bei 66,2 ± 8,8% und 53,5 ± 4,3% (jeweils n = 4).

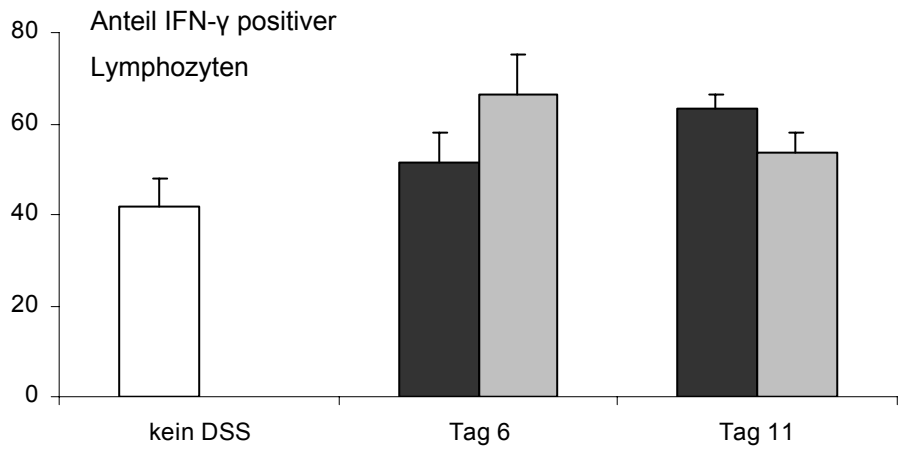


Abbildung 30: Anteil IFN-γ-positiver Lymphozyten aus paraaortalen Lymphknoten von C57BL/6 Mäusen nach Stimulation. Zwischen der Kontrollgruppe (n = 8), der Placebogruppe (n = 3 an Tag 6, sowie n = 3 an Tag 11; dunkle Balken) und der Pralnacasangruppe (n = 4 an beiden Abschlusstagen, hellgraue Balken) fand sich kein signifikanter Unterschied.

Balb/c Mäuse dagegen zeigten einen Anstieg der IFN-γ-Produktion in paraaortalen Lymphknoten unter DSS-Gabe (4,4 ± 0,9% in der Kontrollgruppe; 11,9 ± 1,4% am vierten Tag , 12,5 ± 1,5% am achten Tag und 8,9 ± 0,7% am elften Tag in der Placebogruppe, jeweils p = 0,0184, 0,0052 und 0,0040). Der Effekt von Pralnacasan auf den IFN-γ-Gehalt paraaortaler Lymphozyten war im Gruppenmittel nicht statistisch signifikant fassbar.

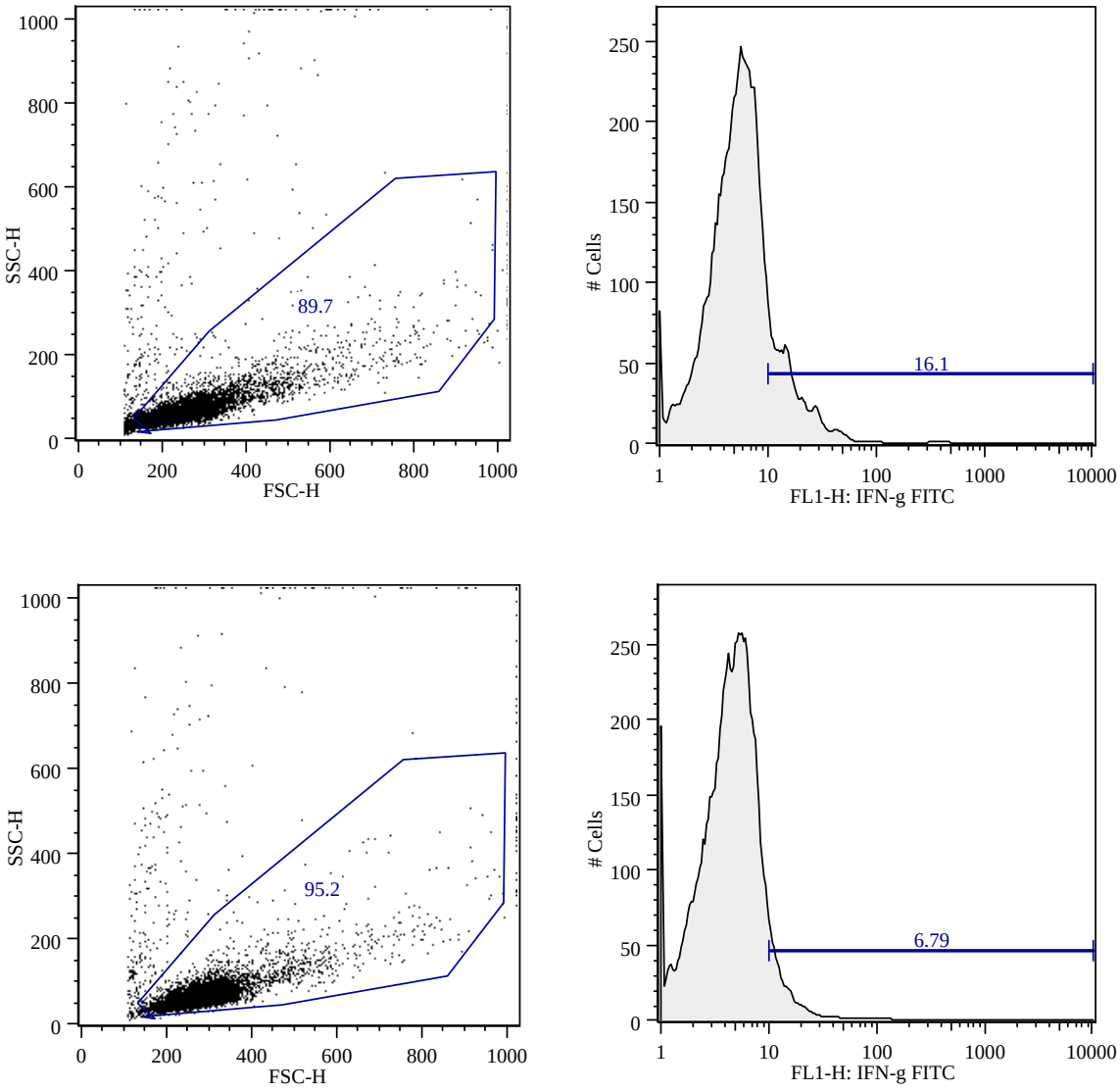


Abbildung 31: Die Zellen im *life gate* wurden auf ihren intrazellulären IFN-γ-Gehalt nach Stimulation getestet. Die obere Reihe zeigt einen FACS-Ansatz einer Balb/c Maus aus der Placebogruppe am elften Tag der DSS-Gabe; die untere Reihe einen Ansatz aus der Pralnacasangruppe am selben Tag. 16,1%, beziehungsweise 6,8% der Zellen im life gate waren in diesen beiden Fällen IFN-γ-positiv.

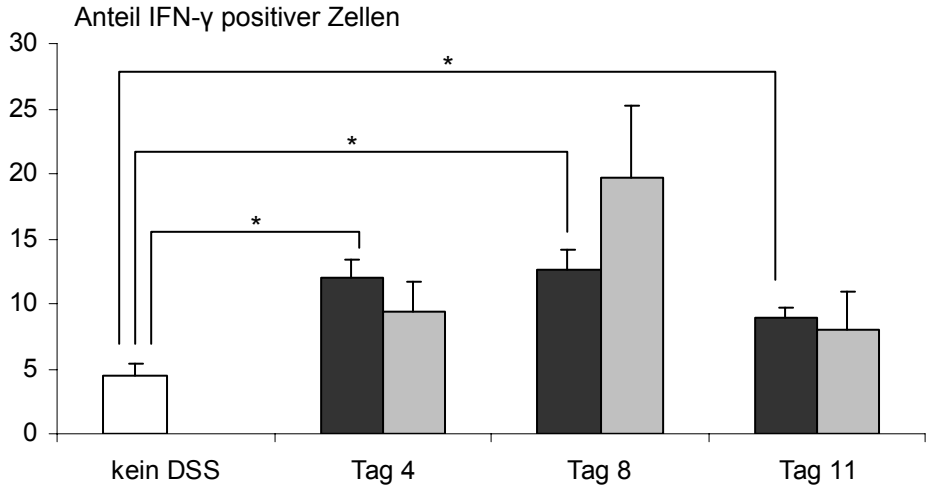


Abbildung 32: In der Gruppenanalyse zeigten alle DSS-Placebogruppen (n = 3, 3 und 4 an den Tagen 4, 8 und 11) signifikant mehr intrazelluläres IFN-γ als die Kontrollgruppe (n = 7). Signifikante Differenzen zwischen Placebo- und Pralnacasangruppe bestanden nicht.

3.4 Additiver Effekt von Pralnacasan mit TNF-α-reduzierenden Substanzen und Wirksamkeit in direkt T-Zell-vermittelten CED-Modellen

3.4.1 Pralnacasan in Kombination mit dem PDE IV-Inhibitor Rolipram

Auf der Suche nach therapeutischen Alternativen für den TNF-α-Antikörper Infliximab, hat sich gezeigt, dass cAMP-erhöhende Substanzen – wie die Phosphodiesterase-Inhibitoren – die Synthese von TNF-α inhibieren [Eigler 1997; Siegmund 1997; Eigler 1998]. Der Phosphodiesterase (PDE) Inhibitor Rolipram wirkt spezifisch auf das Isoenzym Typ IV [Siegmund 2001 c], das sich vorrangig in monozytären Zellen befindet. Rolipram lindert die Symptome der DSS-induzierten Kolitis [Hartmann 2000]. *In vitro* wurde gezeigt, dass sowohl proinflammatorische Zytokine wie TNF-α supprimiert als auch antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 induziert werden [Eigler 1998]. Der Effekt cAMP-erhöhender Substanzen auf die Entzündungsaktivität zeigte sich noch eindrucksvoller beim Test des spezifischen PDE IV-Inhibitors Mesopram [Loher 2003]. Zur Überprüfung der Hypothese eines synergistischen Effekts zwischen einem ICE- und einem PDE IV-Inhibitor wurde jedoch die frei erhältliche Substanz Rolipram verwendet.

Balb/c Mäusen erhielten 3,5% DSS im Trinkwasser über einen Zeitraum von elf Tagen. Acht Mäuse erhielten DSS und wurden lediglich mit der Trägerlösung 25% Cremophor EL i.p. behandelt. Gruppen von jeweils acht Tieren wurden dagegen mit Pralnacasan 50 mg/kg bid i.p., Rolipram 5 mg/kg bid i.p. sowie einer Kombination aus Pralnacasan 25 mg/kg bid i.p.

und Rolipram 2,5 mg/kg bid i.p. behandelt. Am Ende des Versuchs wog die DSS-Gruppe, die keine Therapie erhielt 87% des Ausgangsgewichtes. Die Pralnacasangruppe lag bei 91%, die Rolipramgruppe bei 90% des Ausgangswertes. Tiere, die beide Substanzen in halber Dosierung erhielten, hatten kaum abgenommen und wogen 95% des ursprünglichen Gewichtes. Kontrolltiere, die kein DSS erhielten, nahmen noch zu und lagen schließlich bei 102% ihres Ausgangsgewichtes.

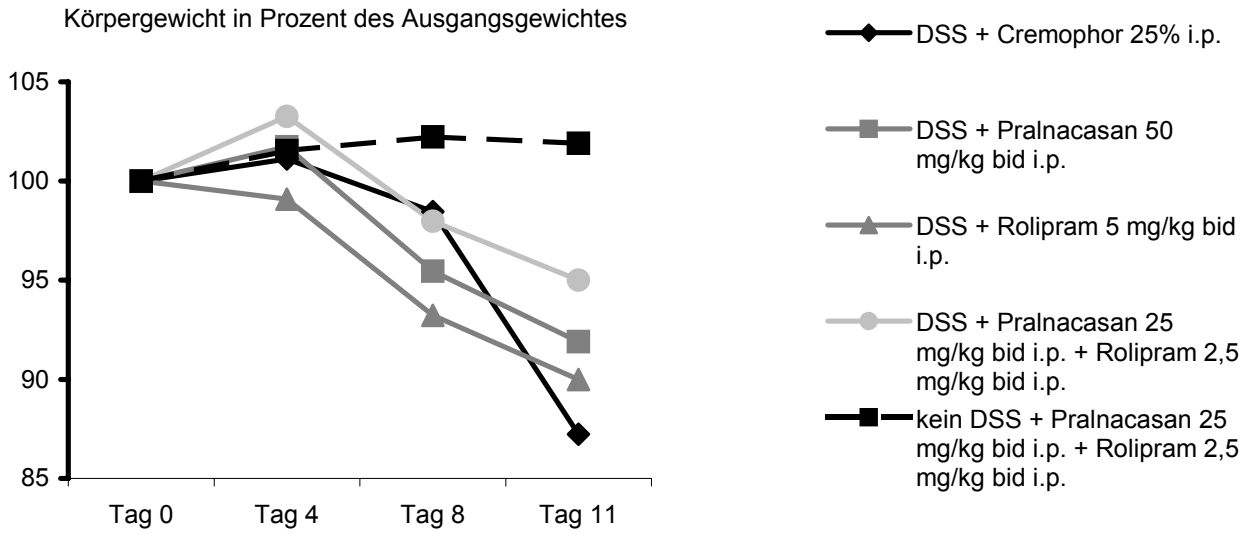


Abbildung 33: Klinischer Verlauf unter DSS-Gabe. Jeweils acht Tiere in vier Gruppen erhielten entweder Placebo, Monotherapie oder eine Kombination. Die Therapie mit der halben Dosis der beiden Substanzen Pralnacasan und Rolipram war effektiver als die Therapie mit der vollen Einzeldosis.

Es wurden Proben des distalen Kolons nach Verblindung histologisch untersucht und ein Score, der sich aus den Parametern Epithelschaden und Infiltration zusammensetzte, gebildet. Signifikante Unterschiede ließen sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht nachweisen.

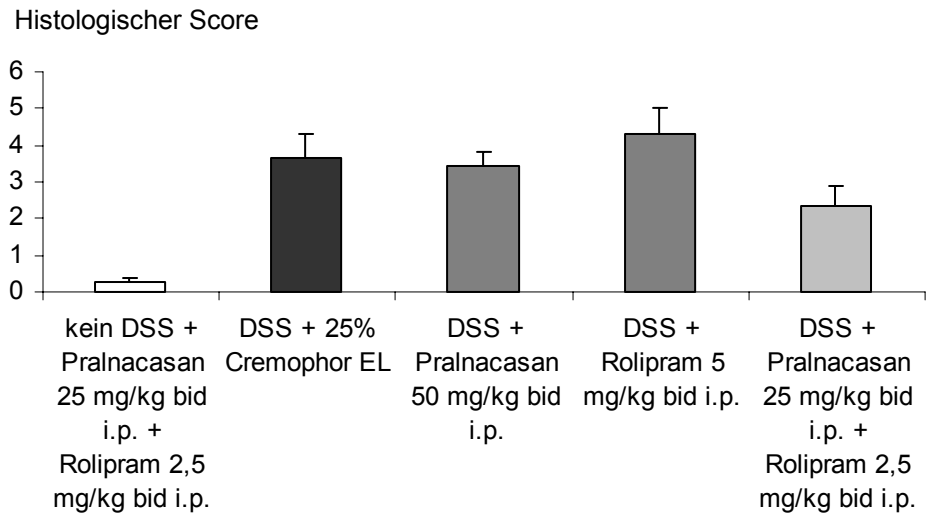


Abbildung 34: Histologische Analyse. Obgleich die Kombinationsgruppe den niedrigsten Scorewert aufwies, waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant.

Es wurden die Zytokine IL-18 und IL-1β auf Proteinebene untersucht. In der Kontrollgruppe fanden sich 318 pg IL-18 pro mg Protein, in der Placebogruppe unter DSS-Gabe 518 pg IL-18 pro mg Protein. In der Pralnacasangruppe zeigte sich eine nichtsignifikante Reduktion auf 387 pg/mg Protein; in der Rolipramgruppe jedoch waren die IL-18-Spiegel sogar erhöht auf 622 pg/mg Protein. Ein synergistischer Effekt beider Substanzen ließ sich nicht fassen: in der halben Dosierung führte Pralnacasan nur zu einer Reduktion der IL-18-Spiegel auf 469 pg/mg Protein im Gruppendurchschnitt.

Im Fall von IL-1β fanden sich nur 20 pg/mg Protein in der Kontrollgruppe. Die DSS-Placebogruppe zeigte 614 pg/mg Protein. In der mit Pralnacasan behandelten Gruppe fiel dieser Wert nichtsignifikant auf 372 pg/mg Protein. Ein synergistischer Effekt von Pralnacasan war somit auf Zytokinebene per ELISA nicht nachweisbar. Auch die TNF-α-Bestimmung erbrachte auf Zytokinebene keinen Anhalt für einen Synergismus beider Substanzen.

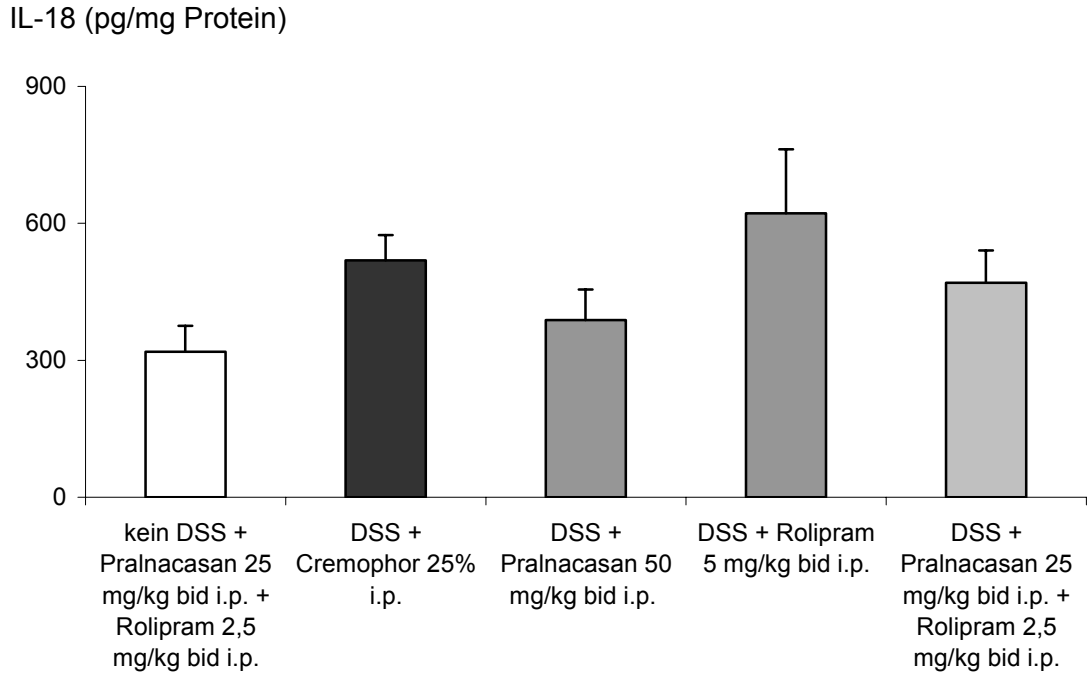


Abbildung 35: In dieser Versuchsreihe ließ sich keine signifikante Erhöhung von IL-18 nach elftägiger DSS-Gabe nachweisen. Es zeigte sich lediglich eine nichtsignifikante Reduktion des IL-18-Spiegels in der Pralnacasangruppe im Vergleich zur Placebogruppe.

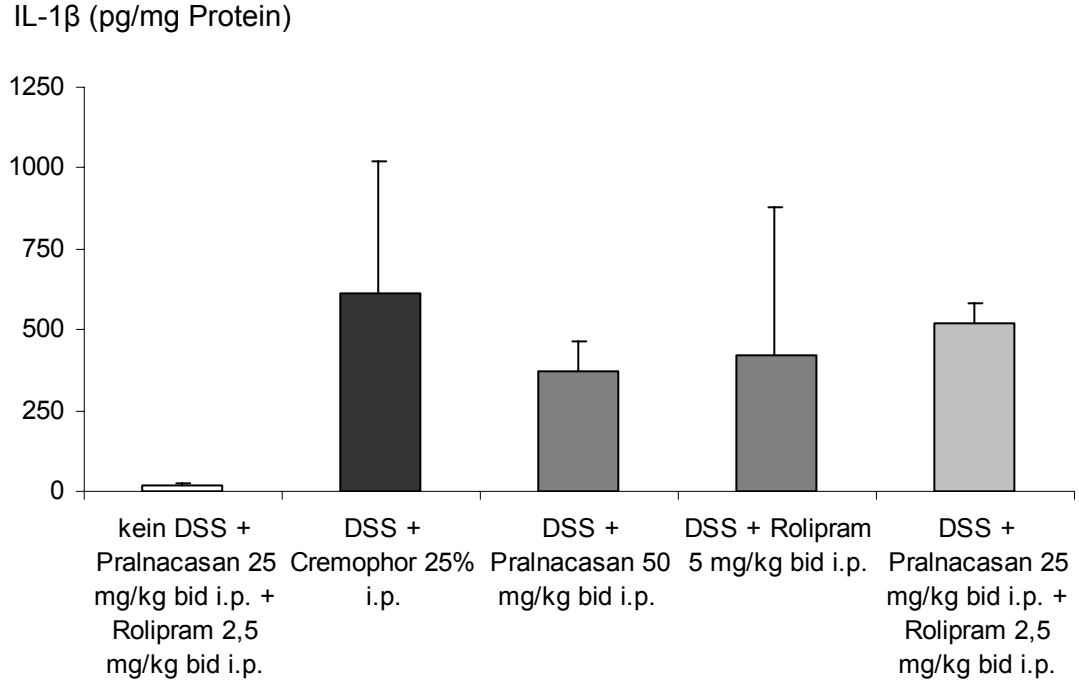


Abbildung 36: IL-1β zeigte nach elftägiger DSS-Gabe einen deutlichen Anstieg, obgleich die Werte das Signifikanzniveau nicht erreichten. Ein Effekt von Pralnacasan ließ sich nicht fassen.

TNF-α (pg/mg Protein)

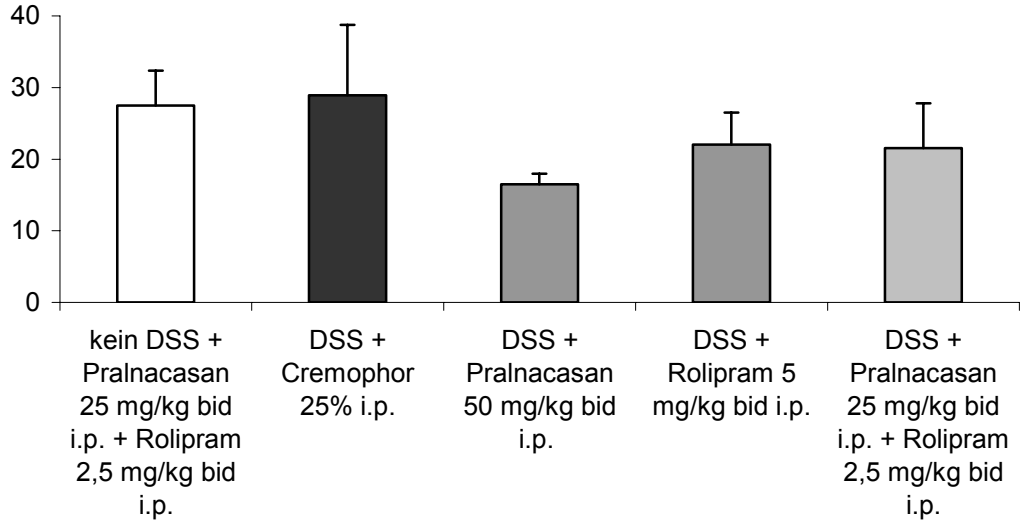


Abbildung 37: Die TNF-α-Spiegel wurden durch den ICE-Inhibitor ebenfalls nicht signifikant beeinflusst. Allenfalls fand sich eine Tendenz hin zu reduzierten TNF-α-Spiegeln in der Pralnacasan i.p.-Gruppe (p = 0,23, n = 8 pro Gruppe).

3.4.2 Pralnacasan im Modell der TNBS-induzierten Kolitis

In einem Pilotversuch wurde untersucht, ob Pralnacasan auch im Modell der TNBS-induzierten Kolitis wirksam ist. Die TNBS-Kolitis gilt als ein durch direkte T-Zell-Aktivierung vermitteltes CED-Modell [Neurath 2000]. TNBS wirkt als Hapten und soll zur Aktivierung von T-Zellen führen. Zwei Gruppen zu je vier Balb/c Mäusen erhielten 2 mg TNBS intrarektal injiziert. Nach sieben Tagen wurde nochmals eine TNBS-Dosis zu 2 mg als Rechallenge appliziert. Eine Gruppe wurde mit Pralnacasan 50 mg/kg KG bid i.p. behandelt, die andere erhielt lediglich die Trägerlösung 25% Cremophor EL. Am neunten Versuchstag wurde der Versuch beendet. Zwei Mäuse erhielten kein TNBS appliziert und dienten als Kontrollgruppe. Vor dem Rechallenge am siebten Tag wiesen beide Gruppen ein mittleres Körpergewicht von 96% des Ausgangsgewichts auf, nachdem die Mäuse der Pralnacasangruppe im Verlauf der sieben Tage stets klinisch etwas schlechter waren als die der Placebogruppe. Nach dem Rechallenge zeigten sich die Mäuse der Placebogruppe in der Lage die Kolitis zu überwinden und erreichten am Versuchsende wieder ihr Ausgangsgewicht. Die Mäuse der Pralnacasangruppe verloren nach erneuter TNBS-Gabe erneut an Gewicht und wiesen am Ende 91% ihres Ausgangsgewichts auf.

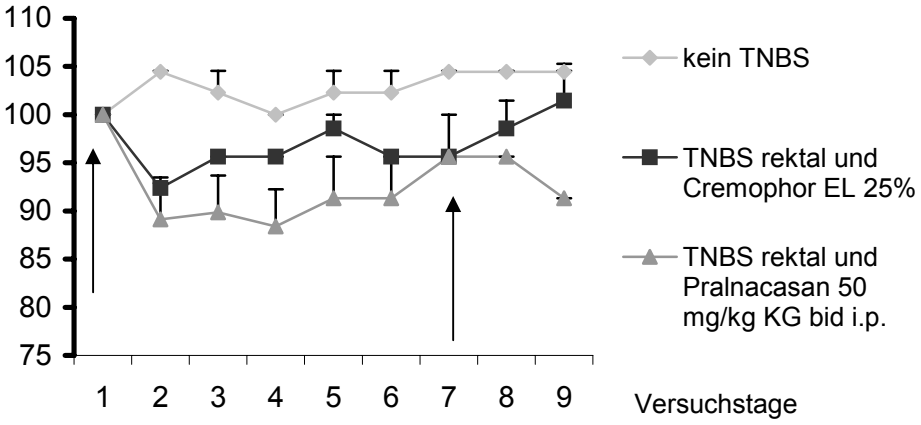


Abbildung 38: Klinischer Verlauf der TNBS-induzierten Kolitis unter Gabe von Pralnacasan sowie unter Placebogabe. Tiere, die mit Pralnacasan behandelt wurden (n = 4) waren sogar anfälliger als Tiere, die lediglich Cremophor EL erhielten. Die beiden Pfeile repräsentieren die initiale TNBS-Gabe sowie den TNBS-Rechallenge am siebten Versuchstag.

3.5 MCP-1 wirkt protektiv im Modell der DSS-induzierten Kolitis

3.5.1 Klinischer Verlauf

Die Infiltration mukosaler Entzündungszellen ist ein Schlüsselereignis in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. MCP-1 steht für monocyte-chemoattractant-protein-1 und kann in entzündeten Bereichen des Kolons von Patienten mit Morbus Crohn vermehrt nachgewiesen werden [Banks 2003; Helwig 2003]. Kürzlich berichteten Omata et al., dass MCP-1 in der Lage ist, die Differenzierung von DCs zu modulieren [Omata 2002]. Die Gruppe schlug eine breitere Rolle für MCP-1 in Entzündungsvorgängen vor. Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit der Rolle von MCP-1 in der Pathogenese der DSS-induzierten Kolitis.

MCP-1 (-/-) Mäuse (n = 10) mit einem genetischen C57BL/6-Hintergrund, erhielten 2 % DSS und wurden mit C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (n = 8) verglichen. Nach acht Tagen wurden die Mäuse geopfert. Kolonstücke wurden histologisch untersucht und die Produktion von Zytokinen und Chemokinen wurde mit Hilfe der Luminex-Technik und *Real-time*-PCR untersucht. MCP-1 (-/-) Mäuse waren anfälliger, nach DSS Gabe ausgeprägte kolitische Symptome zu entwickeln. Zwei Mäuse der MCP-1 (-/-) Gruppe starben schon während des Experiments. Nach acht Tagen hatten die überlebenden Mäuse der MCP-1 (-/-) Gruppe ein Durchschnittsgewicht von 89% ihres Ausgangsgewichts erreicht, wohingegen die Mause der Wildtypgruppe immer noch 99% ihres Ausgangsgewichts besaßen ($p < 0,001$).

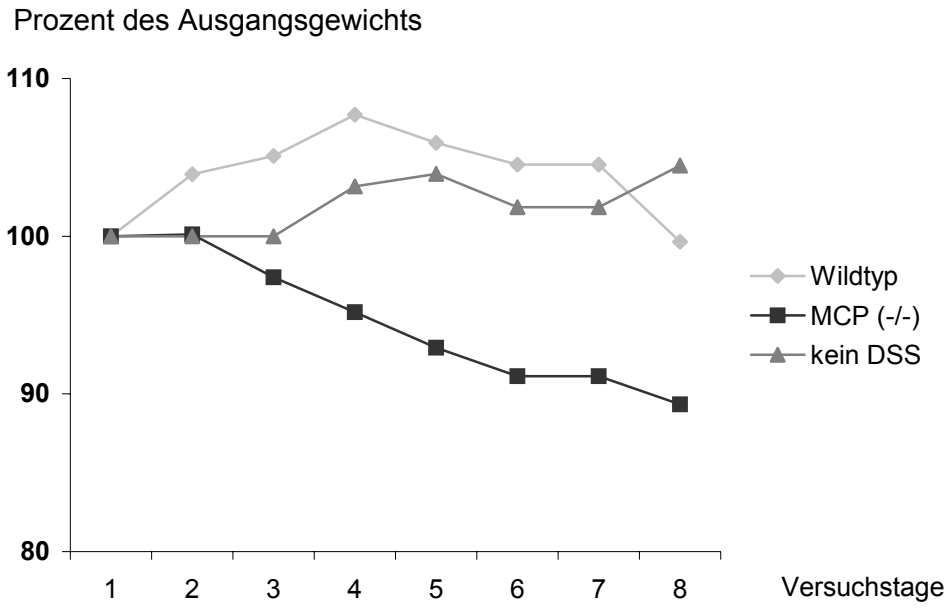


Abbildung 39: Klinischer Verlauf unter DSS-Gabe. Es zeigte sich, dass MCP-1 (-/-) Mäuse schneller Körpergewicht verlieren und kolitische Symptome entwickeln als Wildtyp-Mäuse.

3.5.2 Histologische Analyse

Die histologische Analyse durch einen Pathologen zeigte, dass der Schaden am Epithel, also Fibrose, Erosion und Kryptenverlust, in der MCP-1 (-/-) Gruppe (n = 8) stärker ausgeprägt war als bei den Wildtypmäusen (n = 8, p = 0,052 für den gesamten Epithelschadensscore).

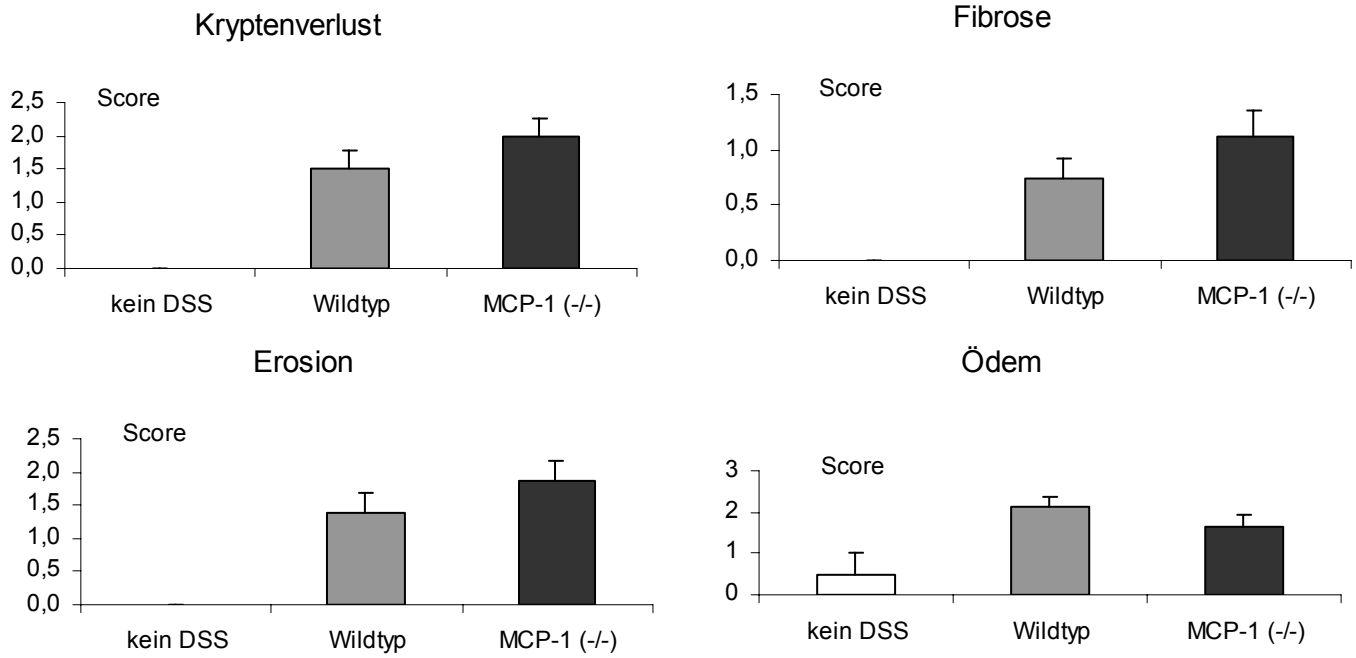


Abbildung 40: Epithelschaden-Score aufgeschlüsselt in die Kategorien Kryptenverlust, Fibrose, Erosion und Ödem. Die MCP-1 (-/-) Mäuse zeigten – mit Ausnahme des Parameters Ödem, das ein relativ unspezifischer Marker der Kolitisaktivität ist – höhere Werte im Epithelschaden-Score. Dieser Befund korrelierte mit der höheren Anfälligkeit der Knockout-Mäuse im klinischen Score.

Interessanterweise war die Granulozyteninfiltration der Wildtypmäuse (n = 8) um 45 % ausgeprägter als in der MCP-1 (-/-) Gruppe (n = 8, p = 0,011). Die Infiltration mononukleärer Zellen war sogar um 70 % stärker als in der MCP-1 (-/-) Gruppe (p = 0,017).

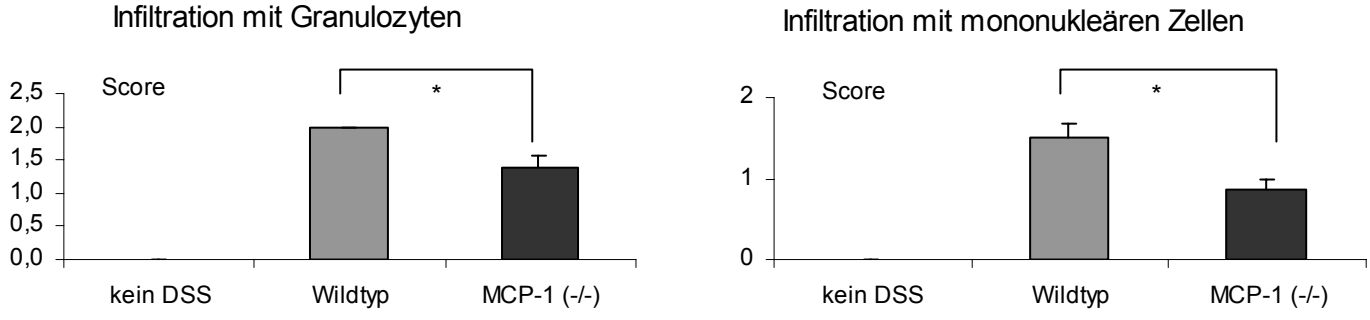


Abbildung 41: Infiltration mit granulozytären und mit monozytären Zellen. Vor allem die monozytäre Infiltration war in den MCP-1 (-/-) Tieren im Vergleich zu den Wildtyptieren stark reduziert. Beide Befunde erreichten Signifikanzniveau.

3.5.3 Zytokinproduktion

Die MIP-1α-Spiegel waren in der Wildtypgruppe (372 ± 50 pg/ml, n = 6) signifikant erhöht verglichen mit der Kontrollgruppe (214 ± 5 pg/ml, n = 2, p = 0,033). In der MCP-1 (-/-) Gruppe waren die MIP-1α-Spiegel nicht erhöht (222 ± 15 pg/ml, n = 7, p = 0,029 verglichen mit der wt-Gruppe). Auch die KC-Spiegel waren gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren. Die MCP-1 (-/-) Mäuse zeigten ebenfalls signifikant erhöhte KC-Spiegel (306 ± 54 pg/ml in der MCP-1 (-/-) Gruppe und 295 ± 41 pg/ml in der Wildtypgruppe verglichen mit 49 ± 1 pg/ml in der Kontrollgruppe). Erwartungsgemäß wurden die IL-5-Spiegel durch die DSS-Gabe nicht beeinflusst und blieben auf niedrigem Niveau. Auch die IFN-γ-Spiegel wurden in diesem Versuch durch die DSS-Gabe nicht signifikant verändert.

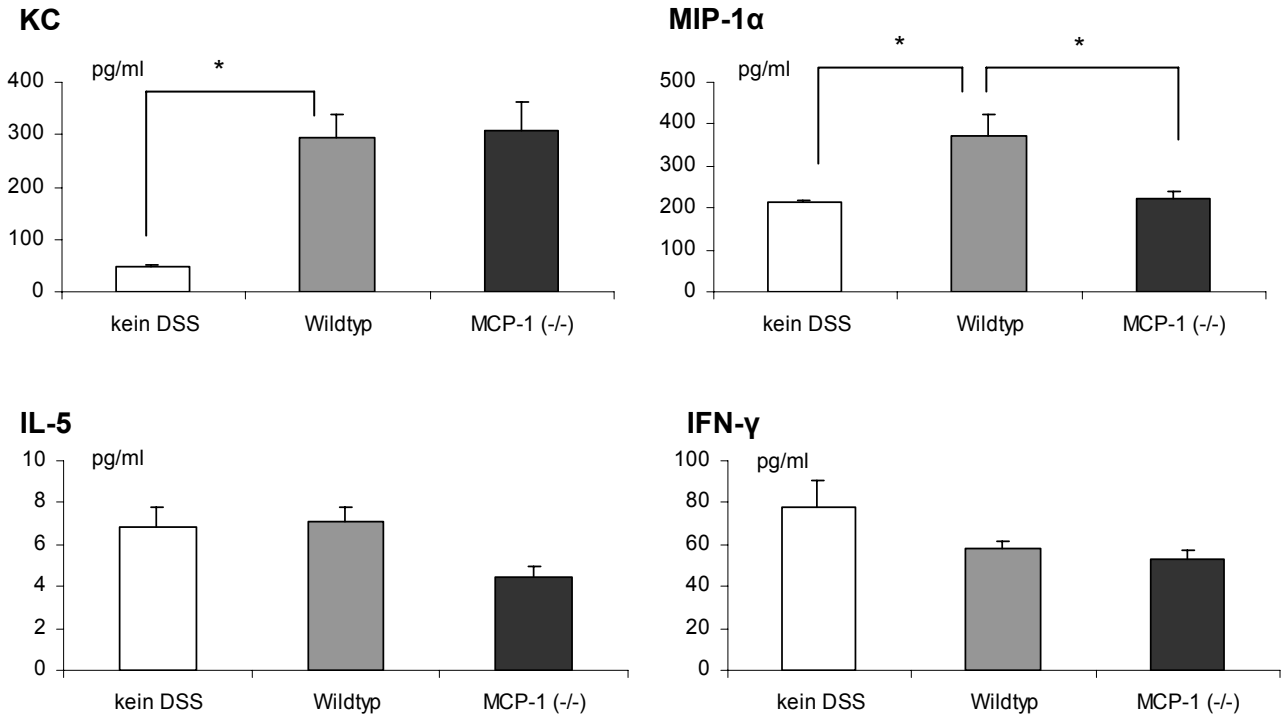


Abbildung 42: KC, MIP-1α, IL-5 und IFN-γ in Kolonhomogenat. Erwartungsgemäß wurde IL-5 durch die DSS-Gabe nicht beeinflusst, KC und MIP-1α stiegen dagegen signifikant an. MCP-1 (-/-) Mäuse zeigten unter DSS-Gabe keinen MIP-1α-Anstieg.

3.5.4 IP-10-mRNA-Expression

Unter DSS stieg die IP-10-mRNA-Expression in Kolongewebe von 48 ± 8 Kopien pro eine Million GAPDH-Kopien in der Kontrollgruppe (n = 2) auf 528 ± 228 Kopien in der Wildtypgruppe (n = 8) an. Der MCP-1-Knockout führte zu einer Reduktion dieses Anstiegs auf 147 ± 95 Kopien (n = 8).

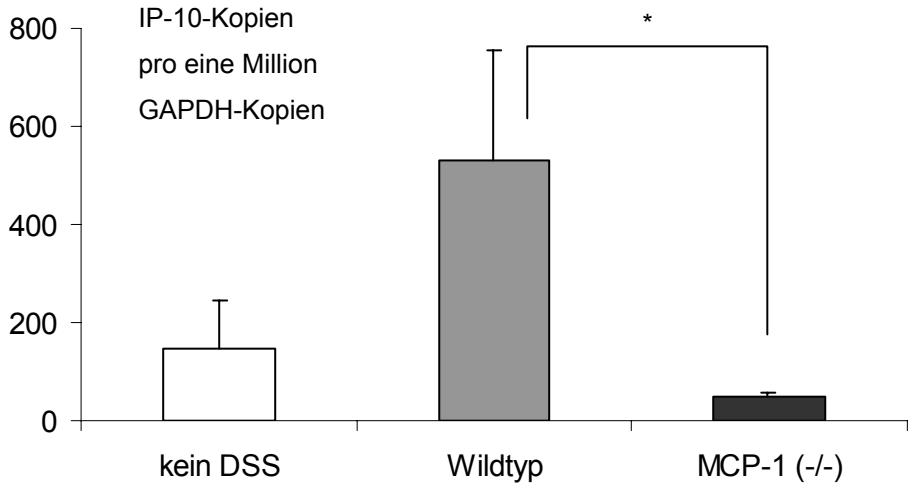


Abbildung 43: IP-10-mRNA-Expression in Kolongewebe. Nur in Wildtypmäusen kommt es unter DSS-Gabe zu einer signifikanten Zunahme der IP-10-mRNA-Expression.

3.5.5 Gewichtsverlust und Darmlänge

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden erneut jeweils zehn MCP-1 (-/-) Mäuse und 10 Wildtyp-Mäuse über einen Zeitraum von acht Tagen mit 2% DSS im Trinkwasser *ad libitum* behandelt (ohne Abbildung). Erneut zeigten die Mäuse der Wildtypgruppe geringeren Gewichtsverlust als die Mäuse der MCP-1 (-/-) Gruppe. In der Wildtypgruppe erreichten die Mäuse bei Versuchsende 94,8 ± 1,0% ihres Ausgangsgewichts; in der MCP-1 (-/-) Gruppe dagegen war der Wert auf 89,3 ± 1,7 % gesunken (p = 0,018). Mäuse der Kontrollgruppe, die kein DSS erhielten, zeigten keine Veränderung ihres Körpergewichts (99,8 ± 0,9%, n = 4). Die Darmlänge unter DSS-Gabe fiel von 7,8 ± 0,3 cm in der Kontrollgruppe auf 6,1 ± 0,2 cm in der Wildtypgruppe ab. Bei den MCP-1 (-/-) Mäusen fand sich eine noch stärkere Reduktion der Darmlänge auf 5,4 ± 0,2 cm (p = 0,034 im Vergleich zur Wildtypgruppe).

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.1.1 Der Interleukin-1β-converting-enzyme-Inhibitor Pralnacasan lindert die DSS-induzierte Kolitis

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Wirksamkeit eines Interleukin-1β-converting enzyme (ICE)-Inhibitors in einem Tiermodell chronisch entzündlicher Darmerkrankungen demonstriert. Die Mäuse erhielten 3,5% DSS im Trinkwasser; die sich entwickelnde Kolitis wurde durch einen klinischen Score quantifiziert. *Post mortem* wurde die Kolonlänge gemessen und durch einen Pathologen eine histologische Analyse durchgeführt. Der Spiegel an Zytokinen im Kolonhomogenat wurde per ELISA bestimmt. Des weiteren wurde die Synthese von IFN-γ in paraaortalen Lymphknoten und in kultivierten und mit PMA stimulierten Splenozyten quantifiziert. In allen genannten Endpunkten zeigte sich, dass die DSS-induzierte Kolitis durch die Gabe des ICE-Inhibitors Pralnacasan gelindert wird.

4.1.2 Pralnacasan bewirkt die Reduktion einer IL-18-vermittelten Th1-Immunantwort im Modell der DSS-induzierten Kolitis

In den Versuchsreihen zum zeitlichen Verlauf der DSS-induzierten Kolitis wurden zwei verschiedene Mausstämme verwendet. C57BL/6 Mäuse besitzen einen genetischen Hintergrund, der sie für eine Th1-Immunantwort prädestiniert. Balb/c Mäuse dagegen tendieren – wenn immunologisch herausgefordert – dazu, eine Th2-Immunantwort zu generieren. Pralnacasan war in beiden Mausstämmen wirksam; die Effektivität des ICE-Inhibitors war in den C57BL/6 Mäusen ausgeprägter. Zytokine wurden per *Real-time*-PCR auf mRNA-Ebene und per ELISA auf Proteinebene bestimmt. Der Anstieg von IP-10-mRNA, nicht jedoch von TNF-α-mRNA unter DSS-Gabe wurde durch Pralnacasan signifikant supprimiert. Die IFN-γ- und IL-18-Proteinspiegel in Kolonhomogenat wurden durch Pralnacasan reduziert; es fand sich jedoch nur ein geringer und nichtsignifikanter Effekt von Pralnacasan auf die TNF-α- und IL-12-Spiegel. Die klinische Wirksamkeit von Pralnacasan korrelierte in den C57BL/6 Mäusen mit der Suppression von IFN-γ. Damit scheint eine spezifische Inhibierung einer IL-18-vermittelten Immunantwort ein entscheidender pathophysiologischer Mechanismus der Pralnacasanwirkung zu sein. Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der DSS-induzierten Kolitis zeigte – mit Ausnahme des Zytokins IL-1β – die höchsten Spiegel proinflammatorischer Zytokine in der frühen Phase der DSS-Gabe,

jedoch einen stetigen Anstieg der mRNA-Expression mit Maximalwerten in der Spätphase des Versuchs.

4.1.3 Untersuchung alternativer Parameter der Kolitisaktivität in der Spätphase der DSS-induzierten Kolitis

Die TNF-α-mRNA-Expression stieg unter DSS-Gabe an, wurde durch Pralnacasan jedoch nur wenig beeinflusst. Die Menge an TNF-α-mRNA korrelierte gut mit dem klinischen Score der Versuchstiere. Die KC-Expression im Kolon wurde durch Pralnacasan signifikant reduziert. Die mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine in paraaortalen Lymphknoten wurde durch Pralnacasan nur wenig beeinflusst. In der FACS-Analyse von Lymphozyten aus paraaortalen Lymphknoten zeigten sich erhöhte Spiegel von IFN-γ in Balb/c Mäusen, nicht jedoch in C57BL/6 Mäusen.

4.1.4 Additiver Effekt von Pralnacasan mit TNF-α-reduzierenden Substanzen und Wirksamkeit in direkt T-Zell-vermittelten CED-Modellen

Zusammenfassend ist festzustellen, dass im DSS-Modell ein klinisch nachweisbarer, jedoch geringer additiver Effekt von Pralnacasan mit dem PDE IV-Inhibitor Rolipram besteht. Es bestätigte sich die Wirksamkeit von Pralnacasan und Rolipram an Hand des klinischen Scores, wobei der ICE-Inhibitor dem PDE IV-Inhibitor überlegen war. Im histologischen Score waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen; ebenso ließ sich das Zusammenwirken beider Substanzen auf Zytokinebene nicht nachweisen. Im Pilotversuch zur Wirkung von Pralnacasan im TNBS-Modell hatte die Gabe des ICE-Inhibitors keinen die Kolitis reduzierenden Effekt. Im Gegenteil waren Mäuse der Pralnacasangruppe sogar anfälliger gegenüber der TNBS-induzierten Kolitis.

4.1.5 MCP-1 besitzt einen protektiven Effekt im Modell der DSS-induzierten Kolitis

MCP-1 (-/-) Mäuse aus einem C57BL/6 Stamm reagierten empfindlicher auf die Gabe von 2% DSS als Wildtyptiere und entwickelten innerhalb von acht Tagen starke kolitische Symptome, wie sich an Hand des Epithelschadensscores nachweisen ließ. Vor allem die monozytäre Infiltration war in den Knockout-Tieren signifikant beeinträchtigt. MCP-1 (-/-) Tiere produzierten signifikant weniger MIP-1α und auch die IP-10-mRNA-Expression war in den Knockout-Tieren gestört.

4.2 Diskussion der Ergebnisse vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur

4.2.1 Der ICE-Inhibitor Pralnacasan lindert die DSS-induzierte Kolitis

Die Behandlung mit Pralnacasan verringerte dosisabhängig die klinische Symptomatik. Die orale Gabe von 50 mg/kg bid Pralnacasan führte zu einem deutlichen Behandlungseffekt, wohingegen die Gabe von 12,5 mg/kg bid Pralnacasan keine therapeutische Wirksamkeit zeigte. Die intraperitoneale Gabe war wirksamer als die orale Gabe der Substanz. Bei i.p. Behandlung erreichte die Differenz zur Placebogruppe an den Tagen 6 mit 10 statistische Signifikanz. Die p.o. Gabe trägt das Risiko in sich, ösophageale Strukturen zu verletzen, was letztlich zu einem positiven Hämocculttest führen kann. Um diesen Bias zu eliminieren, erhielten Tiere der Placebogruppe die Trägersubstanz HEC ebenfalls peroral verabreicht. Vorstudien in unserer Gruppe hatten gezeigt, dass die intraperitoneale Verabreichung von Cremophor EL keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der DSS-induzierten Kolitis nimmt.

Das intrazellulär gelegene Enzym ICE bewirkt die Aktivierung von IL-18 und IL-1β. Die Spaltung der Proformen ist notwendig für die Sezernierung der Zytokine in den Extrazellulärraum [Netea 2000]. In der Tat wies zumindest die intraperitoneal mit Pralnacasan behandelte Mausgruppe signifikant reduzierte IL-18-Spiegel auf. Die Beobachtung, dass die p.o. Gruppen keine reduzierten IL-18-Spiegel aufwiesen, deckt sich mit dem klinischen Befund, dass die intraperitoneale Gabe sehr viel effektiver ist als die perorale. Auch IL-1β wurde durch Pralnacasan reduziert, wenngleich dieser Befund das Signifikanzniveau nicht erreichte.

Gemäß des aus *in vitro*-Daten gewonnenen Konzepts von der Wirkungsweise des Enzyms ICE und der Zytokine IL-18 und IL-1β, sollte eine Inhibierung von ICE eine Suppression der IFN-γ-Expression nach sich ziehen. In der Tat wurde der Anstieg der IFN-γ-Produktion in paraaortalen Lymphknoten nach DSS-Gabe durch Pralnacasan dosisabhängig reduziert. Kultivierte Splenozyten von Mäusen, die DSS und Placebo erhielten, produzierten unter Stimulation signifikant höhere Mengen an IFN-γ. Die Suppression der IFN-γ-Produktion in Splenozyten, die aus Pralnacasan-behandelten Mäusen gewonnen wurden, spricht für einen systemischen antiinflammatorischen Effekt des ICE-Inhibitors.

Ende der neunziger Jahre untersuchte die Arbeitsgruppe von Fantuzzi mit Hilfe von ICE-defizienten Mäusen den Wirkmechanismus des Enzyms ICE und seiner Substrate pro-IL-18 und pro-IL-1β in verschiedenen Entzündungsmodellen und fand, dass vor allem die Inhibierung von IL-18, weniger die Neutralisierung von IL-1β, für den

entzündungshemmenden Effekt des Knockouts verantwortlich ist [Fantuzzi 1998; Netea 2000]. Die Bedeutung von IL-18 im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen konnte in einer Reihe von Tiermodellen bestätigt werden. Ten Hove et al. demonstrierten eine Linderung der TNBS-induzierten Kolitis durch Blockade von endogenem IL-18 durch ein rekombinantes humanes IL-18-binding-protein. In den Experimenten, die von der Gruppe berichtet wurden, fanden sich reduzierte Spiegel an TNF-α, IL-1β and IL-6 in den Kolonhomogenaten der IL-18-binding protein-behandelten Tiere [Ten Hove 2001].

Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass eine direkte anti-IL-18 Strategie die DSS-induzierte Kolitis dosisabhängig lindert [Siegmund 2001 a]. In den Kolonhomogenaten wurden unter DSS-Gabe niedrigere IFN-γ-Spiegel in den Anti-IL-18-behandelten Mäusen gefunden als in der Gruppe der unbehandelten Mäuse. Die Blockade von IL-1β reduzierte die Entzündung dagegen nur wenig. Ebenfalls von Siegmund et al. wurde eine reduzierte DSS-Empfindlichkeit bei ICE-Knockout-Mäusen beschrieben [Siegmund 2001 d]. Durchflusszytometrische Analysen isolierter mesenterialer Lymphknotenzellen zeigten eine reduzierte Zellaktivierung bei den Mäusen der Knockout-Gruppe. Das Interleukin-1β-converting-enzyme und das Zytokin IL-18 spielen somit gemäß dieser Arbeiten eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der DSS-induzierten Kolitis.

Die Grundfrage bei diesen tierexperimentellen Studien ist, ob es in den verwendeten Tiermodellen zu einer Aktivierung von Th1-Zellen kommt und die Modelle damit dem Paradigma der Pathogenese des Morbus Crohn entsprechen. Gerade für das Modell der DSS-induzierten Kolitis liegen divergierende Ansichten vor. Gabe von DSS induziert auch in SCID-Mäusen, die über keine funktionsfähigen T-Zellen verfügen, eine kolitische Symptomatik [Axelsson 1996]. Im Gegensatz dazu stellten Hans et al. fest, dass die Gabe von murinem IL-12 zu einer Exazerbation der DSS-induzierten Kolitis führt. Der Effekt war durch erhöhte IFN-γ-Spiegel vermittelt und wurde durch simultane Gabe von anti-IFN-γ vollständig supprimiert. Anti-IL-12-Behandlung hatte dagegen nur eine schwach lindernde Wirkung auf den klinischen Verlauf der DSS-Kolitis [Hans 2000]. Die Autoren nahmen an, dass es im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis zu einer Th1-vermittelten Immunantwort kommt, die durch Anti-Th1-Strategien supprimiert werden kann. Aktives IL-18 bewirkt die Expression des Th1-Zytokins IFN-γ [Dinarello 1999]; IL-12 kann die IFN-γ-Produktion nochmals synergistisch steigern. Auch die Arbeiten von Siegmund et al. und Fantuzzi et al. beruhen auf der Vorstellung, dass es durch Vermittlung von IL-18 zu einer Aktivierung von Th1-Zellen kommt [Fantuzzi 1997; Fantuzzi 1998; Siegmund 2002].

Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstützen das Konzept einer durch IL-18-vermittelten Th1-Immunantwort im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis. Es zeigten sich erhöhte IL-18-Spiegel sowie eine Erhöhung der IFN-γ-Produktion paraaortaler Lymphknoten nach DSS-Gabe. Pralnacasan griff exakt an diesem Schlüsselereignis der Pathogenese an. Der ICE-Inhibitor reduzierte den lokalen IL-18-Spiegel, inhibierte damit die Induktion von IFN-γ und reduzierte so die Th1-Immunantwort nach DSS-Gabe.

Um die Pathophysiologie der DSS-induzierten Kolitis und die Wirkungsweise des ICE-Inhibitors Pralnacasan in diesem Modell genauer zu charakterisieren, wurden die folgenden Versuchsreihen zum zeitlichen Verlauf der DSS-induzierten Kolitis durchgeführt.

4.2.2. Pralnacasan bewirkt die Reduktion einer IL-18-vermittelten Th1-Immunantwort im Modell der DSS-induzierten Kolitis

Trotz der breiten Anwendung des DSS-Modells als Screening-Instrument für innovative Therapieansätze, ist die Pathophysiologie dieses Modells weitgehend ungeklärt. Insbesondere ist unklar, ob die DSS-induzierte Kolitis als Modell des Morbus Crohn, also eines dezidiert Th1-vermittelten Geschehens, dienen kann [Parronchi 1997; Plevy 1997]. Dielemann et al. und Axelsson et al. haben berichtet, dass auch in SCID-Mäusen durch DSS kolitische Symptome erzeugt werden können [Dieleman 1994; Axelsson 1996]. Daher wurde vorgeschlagen, dass die Aktivierung von Makrophagen das Schlüsselereignis in der Pathogenese der DSS-induzierten Kolitis ist. Shintani et al. haben vorgeschlagen, dass CD4-positive Helferzellen durch Makrophagen aktiviert werden und dann die inflammatorische Kaskade anstoßen [Shintani 1998].

In dieser Studie wurde der ICE-Inhibitor Pralnacasan als Instrument zur Klärung der pathophysiologischen Mechanismen der DSS-induzierten Kolitis verwendet. Pralnacasan wirkt – dem aus *in vitro* Versuchen entwickelten Paradigma entsprechend – auf die Kaskade IL-18/IL-1β – IFN-γ – Th1-Antwort. Außerhalb dieser Kaskade liegende Zytokine sollten durch Pralnacasan nur wenig, beziehungsweise nur sekundär beeinflusst werden. Daher wurden – im folgenden dargestellt – Verlaufsprofile spezifischer Zytokine in Kolongewebe untersucht. Dabei wurden sowohl Proteinspiegel durch ELISA als auch mRNA-Spiegel durch *Real time*-RT-PCR untersucht. Durch Korrelation mit der klinischen Wirksamkeit von Pralnacasan sollte so ein Beitrag zur Klärung der Pathophysiologie der DSS-induzierten Kolitis geleistet werden.

Pralnacasan war in der Lage, den klinischen Verlauf der DSS-induzierten Kolitis zu lindern. Balb/c Mäuse zeigten nach vier Tagen unter Gabe von 3,5% DSS Symptome einer Kolitis;

C57BL/6 Mäuse erhielten 1,5% DSS und entwickelten innerhalb von sechs Tage eine schwere Kolitis. In beiden Mausstämmen konnte Pralnacasan die Induktion der Kolitis um mehrere Tage verzögern. Die Wirksamkeit war vor allem in C57BL/6 Mäusen sehr hoch. Diese Mäuse initiieren deutlicher als Balb/c Mäuse eine Th1-Immunantwort. Da IL-18 eine aktivierende Wirkung auf IFN-γ und damit die Th1-Antwort besitzt, sollte der ICE-Inhibitor gerade in Th1-Modellsystemen besonders wirksam sein.

Die besonders hohe therapeutische Wirksamkeit von Pralnacasan in C57BL/6 Mäusen spricht daher für den angenommenen Wirkmechanismus des ICE-Inhibitors Pralnacasan im Modell der DSS-induzierten Kolitis. Ein weiteres Indiz für die spezifische Wirkungsweise von Pralnacasan ist die vollständige Unterdrückung des Anstiegs der IP-10-mRNA-Expression. IP-10 ist das IFN-γ inducible protein-10. Die Expression des Chemokins wird durch IFN-γ reguliert, das seinerseits von IL-18 beeinflusst wird [Cassatella 1997; Gasperini 1999]. IL-18 wird durch ICE aktiviert und somit sprechen obige Befunde nicht nur für die therapeutische Wirksamkeit von Pralnacasan, sondern auch für die bedeutende pathophysiologische Rolle, die das IL-1β-converting-enzyme ICE im Modell der DSS-induzierten Kolitis spielt. In Balb/c Mäusen zeigte Pralnacasan ein ähnliches Wirkungsmuster. Die IP-10-mRNA-Expression stieg auch hier unter DSS-Gabe an und dieser Anstieg wurde durch Pralnacasangabe reduziert, obgleich dieser Befund in Balb/c Mäusen keine statistische Signifikanz erreichte. In der Zusammenschau reduzierte Pralnacasan IL-18, IFN-γ und IP-10. Die Daten sprechen daher dafür, dass in empfänglichen Mausstämmen eine IL-18-vermittelte Th1-Immunantwort die DSS-induzierte Kolitis wesentlich pathogenetisch vermittelt.

Im Gegensatz dazu wurde die TNF-α-mRNA-Expression durch Pralnacasan nicht signifikant beeinflusst. TNF-α sollte – dem theoretischen Konzept entsprechend – durch ICE-Inhibition nicht mechanistisch beeinflusst werden. Unsere Daten aus Versuchen an Balb/c Mäusen, vor allem aber an C57BL/6 Mäusen, belegen dieses Konzept und unterstützen somit nochmals die spezifische Wirkungsweise von Pralnacasan.

Die Regulation der IL-18-mRNA-Expression im Rahmen entzündlicher Prozesse ist in der Literatur noch nicht endgültig geklärt. Stallmach et al. haben berichtet, dass sie in Patientenmaterial bei Morbus Crohn erhöhte IL-23-, nicht jedoch erhöhte IL-18-Expression fanden [Stallmach 2002]. Mehrheitlich wird von einer konstitutiven Expression von IL-18-mRNA und einer posttranskriptionalen Regulation von IL-18 – vermittelt durch ICE – ausgegangen [Siegmund 2002]. Sivakumar et al. jedoch berichteten im DSS-Modell über erhöhte IL-18-mRNA-Spiegel nach Gabe von 2% DSS an C57BL/6 Mäuse, wobei der Anstieg allerdings sehr moderat war im Vergleich zu anderen Zytokinen [Sivakumar 2002].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten diesen Befund nicht erhärten. Vielmehr wurde IL-18-mRNA auf unterschiedlich hohem Niveau (starke Expression in C57BL/6 Mäusen) konstitutiv exprimiert und ließ sich durch DSS-Gabe nicht beeinflussen. Somit unterstützen die Daten zur IL-18-mRNA-Expression das Konzept einer durch ICE regulierten IL-18-Aktivität in Entzündungsmodellen [Ghayur 1997; Gu 1997; Fantuzzi 1999]. Da Pralnacasan einen posttranskriptionalen Angriffspunkt der IL-18-Regulation verwendet, spricht die klinische Wirksamkeit des ICE-Inhibitors für diese Hypothese.

Neben den mRNA-Messungen sollte durch Proteinbestimmung per ELISA der zeitliche Verlauf der DSS-induzierten Kolitis charakterisiert werden. Die Messung von TNF-α, IL-12 und IL-18 zeigte einen signifikanten Anstieg bis zum vierten Tag der DSS-Gabe mit anschließendem Abfall der nachweisbaren Proteinmenge. Pralnacasan reduzierte diesen initialen Peak im Fall von IL-18, nicht jedoch von TNF-α und IL-12, signifikant. Dieser Befund deckt sich mit dem Konzept, dass ICE-Inhibition durch die Verhinderung der biologischen Aktivierung von IL-18 und IL-1β die Aktivierung einer Th1-Antwort reduziert. Die genannten Zytokine werden typischerweise von Makrophagen gebildet [Brewington 2001; Ma 2001]. Die erhobenen Daten stützen somit die These, dass die Aktivierung von Makrophagen ein Schlüsselereignis in der Pathogenese der DSS-induzierten Kolitis ist.

Dabei scheint TNF-α eine – im Vergleich zu IL-18 – weniger entscheidende Rolle in der Induktionsphase der Kolitis zu spielen. Da allein die IL-18-Spiegel in der frühen Phase der DSS-Gabe durch den ICE-Inhibitor reduziert werden konnten, liegt angesichts der deutlichen klinischen Wirksamkeit von Pralnacasan der Schluss nahe, dass es IL-18 ist, dass die Induktion der Kolitis vermittelt. Ebenso wenig wie TNF-α und IL-12, wurde IL-1β in der Induktionsphase durch Pralnacasan beeinflusst.

Allein in C57BL/6 Mäusen konnte die Aktivierung von Th1-Zellen durch die Messung signifikant erhöhter IFN-γ-Spiegel nachgewiesen werden. In Balb/c Mäusen wurde diese Erhöhung nicht gefunden. In Übereinstimmung damit waren die Spiegel des IFN-γ inducible protein-10, die als indirekter Marker der IFN-γ-Produktion bestimmt wurden, in C57BL/6-Mäusen noch deutlicher erhöht als in Balb/c Mäusen.

In der Spätphase der DSS-induzierten Kolitis, kurz bevor die Tiere aufgrund ihrer schweren kolitischen Symptome sterben würden, wurden niedrigere Spiegel an IL-18, IL-12 und TNF-α nachgewiesen als in der Frühphase. Dabei waren die absoluten Werte an TNF-α in den verschiedenen Versuchsreihen, bei denen DSS über elf Tage verabreicht wurde, sehr homogen. Nach elf Tagen DSS-Gabe konnte in keiner unserer Versuchsreihen noch ein

signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und den verschiedenen DSS-Gruppen in den TNF-α-Spiegeln nachgewiesen werden. IL-1β dagegen stieg bis zum Ende der DSS-Gabe kontinuierlich an. Auch hier waren die Absolutwerte nach elf Tagen DSS-Gabe in den Versuchsreihen recht homogen. Somit scheinen die Zytokine IL-18, TNF-α und IL-12 eine bedeutende Rolle in der Induktionsphase der DSS-Kolitis zu spielen, wohingegen IL-1β eher eine Rolle im längerfristigen Verlauf, weniger im Rahmen der Induktion der akuten DSS-Kolitis zu spielen scheint. Diese Befunde decken sich mit früheren Arbeiten, die eine führende Rolle von IL-18, nicht jedoch von IL-1β in der Kolitis-Induktion durch DSS postulierten [Siegmund 2001 a; Siegmund 2001 d; Sivakumar 2002].

Die in der Endphase der DSS-Kolitis stark erhöhten IL-1β-Spiegel erscheinen vor dem Hintergrund sinkender TNF-α-, IL-18- und auch IFN-γ-Spiegel noch unterschätzt. Tomoyose et al. fanden erniedrigte IL-1β-Spiegel am Ende ihres experimentellen Protokolls, sieben Tage nach Beginn der Gabe von 4% DSS [Tomoyose 1998]. Eventuell ist das Absinken der nachweisbaren Zytokinmenge im Kolon durch nichtimmunologische Vorgänge überlagert. Ein Verlust löslichen Proteins in das Darmlumen nach Zerstörung der Epithelbarriere durch DSS könnte die Reduktion proinflammatorischen Proteins in der Spätphase der DSS-Gabe miterklären [Wyatt 1993; Wyatt 1997; Puspok 1998]. Anhalt für einen quantitativen Verlust an Protein in das Darmlumen bietet der Epithelschaden-Score, der erst am achten und elften Versuchstag überhaupt epithelialen Schaden nachweist. Nicht gesondert im Ergebnisteil aufgeführt ist die Verringerung der Darmlänge um 31 % in der Placebogruppe am elften Tag sowie die Tatsache, dass bei makroskopischer Evaluation der Darm blutig tingiert und in seiner Integrität völlig zerstört war. Kürzlich berichteten Renes et al. über eine fünfzigprozentige Reduktion der Kryptenanzahl in Ratten nach DSS-Gabe, sowie Apoptoseinduktion und Proliferationsinhibition der Kryptenzellen [Renes 2002 a; Renes 2002 b]. Die Gruppe schlussfolgerte, dass DSS seine toxische Wirkung auf das Epithel mittels Schädigung der relativ undifferenzierten Kryptenzellen ausübt.

In verschiedenen Entzündungsmodellen wurde vorgeschlagen, die Prozesse in der Induktionsphase eines Entzündungsprozesses von den Vorgängen im Rahmen einer etablierten Entzündung zu trennen. Im TNBS-Modell beispielsweise wurde gezeigt, dass die systemische Gabe von IL-10 zwar die Induktion der Kolitis verhindern kann, aber nicht in der Lage ist, eine bereits etablierte Kolitis zu lindern [Lindsay 2002]. Die Verhältnisse im DSS-Modell sind ungeklärt. So besitzt IL-10 im DSS-Modell – im Gegensatz zur Wirkung im TNBS-Modell – in den ersten Tagen einer etablierten DSS-Kolitis einen die Entzündung reduzierenden Effekt [Lindsay 2004].

Die hohen Spiegel an TNF-α, IL-12, IL-18 und IFN-γ, die von uns in den ersten Tagen der DSS-Gabe gemessen wurden, sprechen für einen wichtigen Einfluss immunologischer Vorgänge in der Induktionsphase der Entzündung. Dass T-Zell-Aktivierung im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis stattfindet, ist vielfach belegt, beispielsweise durch die Beobachtung, dass Cyclosporin und FK506 in diesem Modell wirksam sind [Murthy 1993; Takizawa 1995]. 1998 konnte die Gruppe von Shintani durch Transferexperimente die Bedeutung von T-Zellen direkt belegen. T-Zellen wurden *in vitro* mit DSS-gepulsten Makrophagen geprimt und führten nach Transfer in normale Wildtypmäuse zu einer Verstärkung der Kolitissymptomatik unter DSS-Gabe [Shintani 1998]. Unsere Daten bieten andererseits auch Beleg dafür, dass die Spätphase der DSS-induzierten Kolitis durch toxische Effekte vermittelt ist und den immunologischen Mechanismen dann nur mehr eine untergeordnete Bedeutung zukommt. Der toxische Effekt mit völliger Zerstörung des Epithels kommt gemäß unserer histologischen Analyse dabei erst ab Tag 8 der DSS-Gabe zum Tragen.

Auch bei vorsichtiger Interpretation unserer Daten zum zeitlichen Verlauf der Zytokinspiegel im DSS-Modell kann gefolgert werden, dass eine frühe Induktionsphase und eine Spätphase der akuten DSS-Entzündung unterschieden werden müssen. Dieses Konzept erinnert an die in letzter Zeit diskutierte „hit hard and early“-Hypothese, die davon ausgeht, dass es im Verlauf des Morbus Crohn zu morphologischen Veränderungen im Darmgewebe kommt und in der späten Phase der Entzündung auch andere immunologische Mechanismen greifen als in der initialen Phase [Stallmach 2003]. Beispielsweise scheint der TNF-α-Antikörper bei manchen Subformen des Morbus Crohn in der frühen Phase der Entzündung besser zu wirken als in der bereits etablierten Entzündung [Kugathasan 2000]. Daraus leiten Verfechter der „hit hard and early“-Hypothese die Forderung ab, bereits früh im Krankheitsverlauf nebenwirkungsreiche Immunsuppressiva – wie beispielsweise den TNF-α-Antikörper Infliximab – einzusetzen. Eventuell ist das akute DSS-Modell gerade durch die Darstellung der morphologischen Veränderungen im Verlauf der DSS-Gabe in der Lage, den typischen Krankheitsverlauf des Morbus Crohn – in abgekürzter Form – zu repräsentieren. Eine frühe Phase, gekennzeichnet durch Makrophagen- und Th1-Aktivierung, würde gefolgt werden von einer Spätphase, in der die morphologischen Veränderung sich von den immunologischen Mechanismen entkoppelt haben.

In Übereinstimmung damit war Pralnacasan – das ja lediglich die immunologischen, nicht die rein toxischen Wirkungen des DSS lindern kann – nicht in der Lage, die Kolitis vollständig zu verhindern, sondern konnte die Induktion lediglich um einige Tage verzögern. Somit sprechen unsere Daten dafür, dass sich ein immunologischer Effekt und ein toxischer Effekt im Modell der DSS-induzierten Kolitis überlagern. Es konnte histologisch und per FACS-

Analyse paraaortaler Lymphknotenzellen gezeigt werden, dass die immunologisch-entzündliche Komponente in der weit fortgeschrittenen Kolitis nach langer – elftägiger – DSS-Gabe nicht mehr im Vordergrund steht.

Die vorliegende Arbeit vertritt die Hypothese, dass im akuten DSS-Modell die Kaskade der Kolitisinduktion durch einen initialen Anstieg von IL-18, IL-12 und TNF-α vermittelt wird, wobei vor allem IL-18 pathogenetisch relevant ist. In geeigneten Mausstämmen kommt es in der Folge des IL-18-Anstieges zu einer deutlichen Aktivierung von Th1-Zellen, die IFN-γ produzieren, was zu einer sich selbst unterhaltenden Entzündungsreaktion führt. Die Hypothese einer Aktivierung von Th1-Zellen im Rahmen der Induktionsphase der DSS-Kolitis wird unterstützt zum einen durch die klinische Wirksamkeit von Pralnacasan, zum anderen durch den Befund, dass der ICE-Inhibitor die Prozesse der Induktionsphase spezifisch hemmen kann: IL-18 und – in empfindlichen Mäusen – IFN-γ wurden reduziert; die IP-10-mRNA-Expression wurde supprimiert. Unsere Daten decken sich mit den Konzepten von Fantuzzi und Siegmund, die eine entscheidende Rolle von IL-18 in der DSS-induzierten Kolitis postulierten [Siegmund 2001 a].

Die Ergebnisse sowohl der Proteinmessungen als auch der mRNA-Bestimmung sprechen dafür, dass DSS in empfänglichen, Th1-mediierten Mausstämmen eine Th1-Immunantwort hervorruft. Unsere Daten unterstützen des weiteren das Konzept einer vorangeschalteten Aktivierung von Makrophagen – sei es direkt durch Phagozytose von DSS, sei es indirekt durch die Infiltration von Bakterien nach Zerstörung der epithelialen Mukosabarriere. Die Befunde sprechen somit dafür, dass das DSS-Modell durchaus in der Lage ist, als Modell des Morbus Crohn zu dienen.

Derzeit wird die Substanz Pralnacasan in unserer Arbeitsgruppe im $CD45Rb^{high}$-Transfermodell auf ihre Wirksamkeit getestet. In diesem Modell werden per negativer Depletion CD4-positive Splenozyten gewonnen, die anschließend per FACS-Sorting in eine $CD45Rb^{high}$- und eine $CD45Rb^{low}$-Population getrennt werden. SCID-Mäuse, die die high-Population – der die regulatorischen T-Zellen fehlen – intraperitoneal appliziert bekommen, entwickeln innerhalb von sechs bis acht Wochen eine Kolitis. In diesem Modell sind die immunologischen Mechanismen, die der Substanz Pralnacasan zugrunde liegen, voraussichtlich noch besser zu untersuchen.

4.2.3 Untersuchung alternativer Parameter der Kolitisaktivität in der Spätphase der DSS-induzierten Kolitis

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit ist der Befund, dass Protein- und mRNA-Spiegel verschiedener Zytokine im Modell der DSS-induzierten Kolitis nicht übereinstimmen. IP-10- und TNF-α-mRNA stiegen bis in die Endphase des Versuchs stetig an. Die – im Gegensatz zum TNF-α-Protein – erhöhten TNF-α-mRNA-Spiegel in der Spätphase der Kolitis könnten darauf beruhen, dass die intrazelluläre mRNA-Expression durch die Zerstörung des Kolons nicht so stark beeinträchtigt wird wie die Proteinmenge im Kolonhomogenat. Gerade die TNF-α-mRNA-Expression schien in den obigen Versuchen ein guter Marker für die tatsächliche Schwere kolitischer Symptome zu sein. Da die Messung der Zytokine auf Proteinebene als Endpunkt der DSS-induzierten Kolitis nicht ideal geeignet ist, sollten im folgenden weitere Zytokine auf mRNA-Ebene auf ihre Eignung als Gradmesser des entzündlichen Geschehens untersucht werden.

Vorerst kann festgestellt werden, dass die Technik der konventionellen PCR die Befunde der *Real-time*-PCR bestätigte. Mäuse mit niedrigen Expressionswerten in der *Real-time*-PCR zeigten dasselbe Expressionsniveau in der Bestimmung per konventioneller PCR. Es bestätigte sich, dass die TNF-α-mRNA-Expression ein guter Parameter der Kolitisaktivität ist und sich damit als Endpunkt für das Modell der DSS-induzierten Kolitis eignet. Tiere, die ein bestimmtes Niveau der Kolitissymptomatik erreicht hatten, zeigten regelmäßig erhöhte Werte in der TNF-α-mRNA-Expression. Die TNF-α-Synthese ist die gemeinsame Endstrecke vieler Entzündungsparameter; somit ist die Bestimmung des TNF-α-Spiegels als Endpunkt naheliegend. Der weiterführende Befund der vorliegenden Arbeit ist nun, dass sich die mRNA-Expression dieses Zytokins als Endpunkt der DSS-induzierten Kolitis besser eignet als die Bestimmung der Proteinmenge per ELISA.

Die MCP-1-mRNA-Expression war in Tieren, die DSS erhalten hatten, verstärkt. Dies unterstützt nochmals die Bedeutung der Aktivierung monozytärer Zellen im Rahmen des DSS-induzierten Kolitis. Die MCP-1-mRNA-Expression wird unter anderem durch TNF-α oder IL-1 gesteigert [Leonard 1990]. Ebenso fand sich eine erhöhte KC-mRNA-Expression im Darm von Tieren, die DSS erhalten hatten. KC wird von Monozyten sowie Makrophagen produziert und beispielsweise durch TNF-α induziert [Introna 1987; Koerner 1987; Ohmori 1993; Ohmori 2001]. Auch Endothelzellen synthetisieren KC; das Chemokin selbst ist an der Neutrophilenchemotaxis beteiligt. Pralnacasan war in der Lage, den Anstieg der KC-Expression zu unterdrücken.

Die Untersuchung der mRNA-Expression in Lymphknoten unter DSS-Gabe zeigte, dass dieser Parameter nicht signifikant beeinflusst wird. Allenfalls IL-18 und IP-10 wurden unter DSS-Gabe vermehrt exprimiert. Die TNF-α-mRNA-Expression verharrte dagegen völlig unverändert auf niedrigem Niveau. Dies entspricht insofern den theoretischen Konzepten der TNF-α-Wirkung, als dieses Zytokin als gemeinsame Endstrecke vieler Entzündungskaskaden betrachtet wird. Somit sollte TNF-α im Falle der DSS-induzierten Kolitis vor allem im Kolon erhöht sein; ein Befund, der durch die Experimente des vorangehenden Kapitels bestätigt wurde.

Zwar drainiert die Lymphe des Gastrointestinaltraktes in die paraaortale Lymphknotenregion, so dass Lymphozyten aus diesem Bereich durchaus ein Abbild der lokalen Entzündung im Gastrointestinaltrakt liefern können. Die FACS-Analyse paraaortaler Lymphknoten eignete sich jedoch nur eingeschränkt als Parameter der Kolitisaktivität. In zwei von drei Versuchsreihen dieser Arbeit war die Methode der FACS-Analyse regionaler Lymphknoten in der Lage gewesen, eine Aktivierung der Lymphozyten unter DSS-Gabe nachzuweisen. Der Nachweis des Pralnacasaneffekts gelang jedoch lediglich in der ersten Versuchsreihe mit Balb/c Mäusen; in den beiden folgenden Versuchen – die auch den zeitlichen Verlauf der DSS-induzierten Kolitis untersuchten – gelang dies nicht. Ein Grund dafür, dass die IFN-γ-Produktion in paraaortalen Lymphknoten von C57BL/6 Mäusen nicht anstieg, könnte darin bestehen, dass die Tiere dieses Stammes sehr schnell Th1-Immunantworten generieren und sich der Entzündungsprozess mehr als im Falle von Balb/c Mäusen lokal im Darm abspielt. Insgesamt scheint die durchflusszytometrische Analyse dieser Zellen also eher ein Abbild des systemischen Entzündungszustandes, der sich nach Aktivierung einer Th1-Immunantwort einstellt, zu geben.

Lokale Effekte am Kolon sind demnach am besten durch Bestimmung der mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine nachzuweisen. Auch die Wirkung des ICE-Inhibitors Pralnacasan ließ sich am besten mit Hilfe der *Real-time*-PCR an Kolongewebe nachweisen. Wir haben berichtet, dass das per konfokaler Lasermikroskopie nachgewiesene erhöhte IL-18 vor allem im Bereich der intestinalen Epithelschicht lokalisiert war [Siegmund 2001 a]. Die größten Unterschiede in der Zytokinproduktion sollten sich also in diesem Bereich finden lassen. Dementsprechend war die Analyse der mRNA-Expression in Lymphknotengewebe zum Nachweis eines spezifischen Behandlungseffektes nur eingeschränkt zu verwerten.

Des weiteren fiel auf, das die TNF-α-Expression unter DSS-Gabe zwar signifikant anstieg, jedoch durch ICE-Inhibition nicht beeinflusst wurde. Daher sollte im folgenden untersucht werden, ob ein synergistischer Effekt zwischen Pralnacasan und TNF-α-reduzierenden

Substanzen besteht. Verwendet wurde zu diesem Zweck der spezifische Phosphodiesterase IV-Inhibitor Rolipram. Rolipram ebenso wie die verwandte Substanz Mesopram besitzen TNF-α-reduzierende Wirkung sowie klinische Wirksamkeit im DSS-Modell [Hartmann 2000; Loher 2003].

4.2.4 Additiver Effekt von Pralnacasan mit TNF-α-reduzierenden Substanzen und Wirksamkeit in direkt T-Zell-vermittelten CED-Modellen

Klinisch ließ sich ein geringer additiver Effekt des PDE IV-Inhibitors Rolipram und des ICE-Inhibitors Pralnacasan nachweisen. Konzeptionell wurde gefordert, bei Halbierung der Pralnacasan- sowie der Rolipramdosis zumindest einen ebenso guten Effekt wie bei voller Dosierung der einzelnen Substanzen zu erhalten. Obgleich vom Konzept ansprechend [Obermeier 1999], war in den *in vitro*-Untersuchungen der additive Effekt beider Substanzen nicht zu fassen.

Im Gegensatz zu vorangehenden Versuchen ließ sich die Reduktion des IL-18-Spiegels durch Pralnacasan in diesem Versuch nur als Trend ohne Erreichen des Signifikanzniveaus demonstrieren. Die Messung der Proteinspiegel erfolgte am elften Tag der DSS-Gabe, also zu einem späten Zeitpunkt. Wie oben demonstriert, haben die IL-18-Spiegel hier bereits ihren Höhepunkt überschritten. Die späte Messung dieses Zytokins ist somit zum Nachweis eines additiven Effekts nicht ideal geeignet. In Übereinstimmung mit den obigen Ergebnissen fanden wir deutlich erhöhte IL-1β-Spiegel nach elf Tagen DSS-Gabe. Ein Effekt durch die pharmakologische Inhibierung von Schlüsselenzymen ließ sich nicht nachweisen. Die Bestimmung der TNF-α-Spiegel zeigte, dass – wie aus den vorhergehenden Versuchen zu vermuten war – keine signifikanten Unterschiede zwischen DSS-Gruppen und Kontrollgruppe nach elftägiger Gabe von DSS nachzuweisen waren.

Bezüglich des Nichtansprechens der TNBS-Kolitis auf den ICE-Inhibitor ist festzustellen, dass lediglich ein Pilotversuch mit begrenzter Aussagekraft durchgeführt wurde, so dass diese Ergebnisse der Reproduktion bedürfen. Gleichwohl ist das Versagen der Substanz insofern zu erklären, als das TNBS-Modell im Gegensatz zum DSS-Modell auf direktem Weg T-Zellen aktiviert. Es ist eine der Hauptaussagen dieser Arbeit, dass DSS initial zu einer Makrophagenaktivierung führt [Mahida 2000]. Pralnacasan wirkt auf Zytokine wie IL-18 und IL-1β, die typischerweise von Makrophagen produziert werden. Die Tatsache, dass Pralnacasan im Modell der TNBS-Kolitis sogar mehr schadete als nützte, lässt den vorsichtigen Schluss zu, dass die Aktivierung der IL-18- und IL-1β-vermittelten Entzündungskaskade – in engen Grenzen – sogar protektiven Effekt hat. Gerade die Makrophagenaktivierung durch DSS könnte somit einem physiologischen Mechanismus

entsprechen, der sowohl protektive als auch destruktive Aspekte besitzt. Unter anderem der genaueren Charakterisierung der Rolle monozytärer Zellen im Verlauf der DSS-induzierten Kolitis widmeten sich die Versuche an MCP-1 (-/-) Tieren.

4.2.5 MCP-1 besitzt protektiven Effekt im Modell der DSS-induzierten Kolitis

Unsere Daten weisen darauf hin, dass MCP-1 wichtige regulatorische Funktionen im Modell der DSS-induzierten Kolitis erfüllt. Ursprünglich wurde erwartet, dass der Knockout eines proinflammatorischen Chemokins die Tiere vor den Auswirkungen der DSS-Gabe schützt. Doch der klinische Score und die histologische Analyse zeigten, dass MCP-1 (-/-) Tiere anfälliger sind, kolitische Symptome zu entwickeln. Die durch das chemotaktische Signal von MCP-1 infiltrierenden Zellen waren scheinbar notwendig, um die inflammatorische Antwort einzudämmen. MCP-1 wirkt chemotaktisch auf monozytäre Zellen, weniger auf Neutrophile [Leonard 1990]. Wie an Hand des Monozyteninfiltrationsscores gezeigt werden konnte, wurden in der Tat vor allem die monozytären Zellen durch den Knockout beeinflusst. MIP-1α wird von Makrophagen nach Stimulation produziert [Menten 2002]; somit sprechen auch die reduzierten MIP-1α-Spiegel dafür, dass der MCP-1-Knockout funktionell wirksam war. Bestätigt durch die etwas höhere Granulozyteninfiltration wurden Granulozyten durch den MCP-1-Knockout weniger beeinflusst. Die KC-Produktion wurde durch den Knockout nicht reduziert.

Sowohl die Invasion als auch die Aktivierung von Makrophagen in MCP-1 (-/-) Mäusen waren anscheinend beeinträchtigt. Dies lässt den Schluss zu, dass Makrophagen im pathogenetischen Prozess der DSS-induzierten Kolitis wichtige regulatorische Funktionen erfüllen. Eine geordnete Makrophagenfunktion scheint somit notwendig, um die Maus vor den zerstörerischen Auswirkungen des DSS zu schützen. Dies ist insofern nicht erstaunlich, als doch das herrschende Paradigma der DSS-Wirkung davon ausgeht, dass der Körper auf den DSS-Reiz physiologischerweise mit einer Aktivierung der Makrophagen reagiert. Diesem Vorgang folgt dann die Aktivierung von Th1-Zellen, die unter anderem IP-10 bilden. Die Reduktion der IP-10-Spiegel in den MCP-1 (-/-) Tieren spricht somit für die Modellvorstellung einer durch Makrophagenaktivierung vermittelten DSS-Wirkung mit nachfolgender Th1-Immunantwort. Die Infiltration monozytärer Zellen nach MCP-1-vermittelter Chemotaxis ist somit ein physiologischer Mechanismus, dessen Unterbindung die Knockout-Maus nicht vor DSS schützt, sondern sie anfälliger macht.

4.3 Klinische Relevanz

Erstmals wurde gezeigt, dass die pharmakologische Inhibierung des Interleukin-1β-converting-enzymes (ICE) in einem murinen Modell chronisch entzündlicher Darmerkrankungen therapeutisch wirksam ist. Die Effektivität einer ICE-Blockade konnte in einer Reihe von Experimenten an ICE (-/-) Mäusen demonstriert werden [Fantuzzi 1998]. Das DSS-Modell wird gerne zur Überprüfung neuer Therapiestrategien im Bereich CED verwendet [Cooper 1993]. Anhand einer Vielzahl von *in vivo* sowie *ex vivo* Parametern konnte nun in diesem Modell gezeigt werden, dass der ICE-Inhibitor Pralnacasan eine IL-18-vermittelte Immunantwort reduziert.

Angesichts der hohen Rate an Nebenwirkungen, welche die – in den neunziger Jahren entwickelten – antikörperbasierten Anti-Zytokinstrategien mit sich bringen, sind sowohl Wissenschaft als auch Industrie an weiteren innovativen Substanzen sehr interessiert. Die Therapie mit Infliximab führt in einem hohen Prozentsatz behandelter Patienten zur Bildung von anti-chimärischen Antikörpern und auch die neuere, rein humane Substanz Adalimumab führt zur Bildung von Antikörpern gegen Allotope dieser Substanz [Hanauer 2004]. Somit besteht die Gefahr, dass Infliximab und Adalimumab unter Therapie ihre Wirksamkeit verlieren. Einzelfallberichte postulierten eine Assoziation von Anti-TNF-α-Therapie und lymphoproliferativen Erkrankungen. Große epidemiologische Studien konnten den Zusammenhang nicht bestätigen, trotzdem bleiben die Substanzen auch aufgrund dieses möglichen Risikos umstritten [Wolfe 2004].

Im rheumatologischen Bereich ist der Stellenwert der Anti-Zytokintherapie unumstritten. In der Gastroenterologie jedoch bleiben viele Fragen ungeklärt. Große Studien haben zwar eine zweifelsfreie Evidenzgrundlage für den Einsatz von Infliximab bei steroidrefraktärem sowie fistelndem Morbus Crohn geschaffen [Targan 1997; Present 1999], viele Praktiker sind dennoch zurückhaltend. Bis dato fehlt zudem eine große Studie, die Infliximabgabe bei Morbus Crohn mit Fistelbildung mit der operativen Sanierung vergleicht. Etanercept, das im Bereich der rheumatoiden Arthritis sehr gute Erfolge zeigt, hat im Bereich der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen anscheinend überhaupt keinen Effekt [Sandborn 2001]. Völlig ungeklärt ist derzeit, ob die Anti-TNF-α-Therapie im Bereich Colitis ulcerosa einen Stellenwert besitzt [Rossetti 2004]. Eine ganz neue Entwicklung ist der Anti-Interferon-γ-Antikörper Fontolizumab. In einer aktuellen Studie an 133 Patienten zeigte die Substanz gute Wirksamkeit und vor allem exzellente Verträglichkeit [Hommes 2004]. Allerdings wird die

Substanz wohl ein ähnliches langfristiges Nebenwirkungsprofil besitzen wie die anderen Antikörper-basierten Therapien.

Im Gegensatz zu den proteinbasierten Anti-Zytokin-Therapien verfolgt die Substanz Pralnacasan eine Strategie, bei der nicht die Aktion eines Zytokins inhibiert wird, sondern bei der bereits die Bildung der beteiligten Zytokine unterbunden wird. Pralnacasan ist ein kleines Molekül, das die Aktivität des IL-1β-converting-enzymes hemmt. Das Nebenwirkungsprofil der Substanz ist – nach den Ergebnissen der bisherigen Studien – exzellent. Selbst bei Gabe hoher Dosen traten keine unerwünschten Wirkungen auf. Per Pressemitteilung vom Juli 2003 hat die Firma Vertex mit der Rekrutierung von Patienten für eine Phase IIb-Studie bei rheumatoider Arthritis begonnen. Nach dieser Ankündigung sind bisher keine Ergebnisse veröffentlicht wurden. Es scheint jedoch zu lizenzrechtlichen Schwierigkeiten im Zuge der Umgestaltung des Aventis-Konzerns gekommen zu sein, was die Verzögerung der Entwicklung erklärt. Vertex selbst hat angekündigt, auch Proof-of-concept-Studien zu den Zielindikationen Osteoarthrose und Psoriasis zu initiieren.

Im Bereich chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sind bisher keine weiterführenden Studien im klinischen Bereich geplant. Die Firma Vertex wünscht scheinbar vorerst die Anerkennung der Substanz als Medikament im Bereich der Rheumatologie. Nichtsdestotrotz ist die Vorstellung einer klinischen Studie der Substanz Pralnacasan mit der Indikation CED verlockend.

Der mögliche Stellenwert von Pralnacasan bei der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist reine Spekulation. Nur klinische Studien können klären, ob Pralnacasan im akuten Geschehen hilfreich ist oder eventuell als remissionserhaltende Therapie Eingang in die Klinik finden könnte. Viele Gastroenterologen schrecken vor dem Einsatz von Infliximab bei Morbus Crohn der Nebenwirkungen wegen zurück. Im Bereich der remissionserhaltenden Therapie ist Azathioprin zwar seit vielen Jahren Standardsubstanz, jedoch auch mit schweren Nebenwirkungen verbunden. In diesen Bereichen könnte für Pralnacasan möglicherweise eine Nische im Algorithmus der therapeutischen Optionen bestehen. Gerade das gute Nebenwirkungsprofil macht diese Substanz vielversprechend. Eine klinische Pilotstudie zur Wirksamkeit von Pralnacasan bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erscheint gerechtfertigt.

.

5. Zusammenfassung und Schlussbetrachtung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die pharmakologische Hemmung des Interleukin-1β-converting-enzymes durch den ICE-Inhibitor Pralnacasan in einem Tiermodell chronisch entzündlicher Darmerkrankungen therapeutisch wirksam ist. Pralnacasan linderte signifikant den klinischen Verlauf der DSS-induzierten Kolitis. Durch Messung von Zytokinen in Kolonhomogenat und in Splenozytenüberstand sowie durch durchflusszytometrische Analyse paraaortaler Lymphknoten konnte belegt werden, dass Pralnacasan das lokale und das systemische Entzündungsgeschehen signifikant reduziert.

In C57BL/6 Mäusen, deren genetischer Hintergrund eine Th1-Immunantwort unterstützt, konnte an Hand erhöhter IFN-γ-Spiegel sowie einer gesteigerten IP-10-mRNA-Expression eine Aktivierung von Th1-Zellen nachgewiesen werden. Erstmals im DSS-Modell wurde die IP-10-mRNA-Expression als Parameter der Th1-Aktivierung verwendet. Die Expression des Chemokins IP-10 (CXCL-10) steht unter direkter Regulation durch IFN-γ; dieses wiederum wird reguliert durch IL-18. Somit gibt die IP-10-mRNA-Expression Aufschluss über die Th1-Aktivierung, das Vorhandensein von IFN-γ-Protein sowie die biologische Aktivität von IL-18. Pralnacasan reduzierte den Anstieg der IP-10-Expression und der IFN-γ-Spiegel unter DSS-Gabe signifikant. Demgegenüber war Pralnacasan nicht in der Lage, die unter DSS-Gabe ebenfalls gesteigerte TNF-α-mRNA-Expression wirksam zu supprimieren. Zusammenfassend konnte somit festgestellt werden, dass Pralnacasan die durch IL-18-vermittelte Th1-Immunantwort nach DSS-Gabe reduziert.

Darüber hinaus konnten Erkenntnisse zur Pathophysiologie der DSS-induzierten Kolitis gewonnen werden. So ergaben sich Hinweise für die Richtigkeit der Hypothese, dass es im Modell der DSS-induzierten Kolitis initial zu einer Aktivierung mukosaler Makrophagen kommt, die IL-18, IL-12 und TNF-α produzieren. Eine Steigerung der IFN-γ-Spiegel sowie der IP-10-mRNA-Expression sprachen dafür, dass es im Modell der DSS-induzierten Kolitis zudem zu einer Aktivierung von T-Zellen kommt. Die Daten dieser Arbeit belegen, dass IL-18-mRNA konstitutiv exprimiert und durch DSS-Gabe nicht signifikant beeinflusst wird. Vor allem C57BL/6 Mäuse zeigten ein hohes Expressionsniveau an mRNA dieses Zytokins.

Die Befunde dieser Untersuchung sprechen dafür, dass die Progression der DSS-induzierten Kolitis in der Spätphase durch toxische und somit nicht-immunologische Vorgänge geprägt ist. Gleichwohl finden immunologisch-entzündliche Prozesse statt, wie der Anstieg der IL-1β-Spiegel, die Steigerung der Expression proinflammatorischer mRNA und die erhöhte

Aktivierung paraaortaler Lymphknoten auch in einer späteren Phase der DSS-Gabe beweisen. Die DSS-induzierte Kolitis beinhaltet wichtige pathophysiologische Elemente chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.

Des weiteren untersuchte die vorliegende Arbeit verschiedene alternative Parameter der Kolitisaktivität und etablierte somit neue wertvolle Endpunkte des DSS-Modells. Zudem wurde gezeigt, dass ein geringer, aber klinisch nachweisbarer additiver Effekt von Pralnacasan mit TNF-α-reduzierenden Substanzen besteht. Pralnacasan zeigte keine Wirksamkeit in einem Pilotversuch zur TNBS-induzierten Kolitis.

Die Arbeiten an MCP-1 (-/-) Mäusen erbrachten Hinweise darauf, dass das Chemokin MCP-1 wichtige regulatorische Funktionen im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis übernimmt. MCP-1 (-/-) Mäuse waren anfälliger Symptome der DSS-induzierten Kolitis zu entwickeln als Wildtypmäuse.

In der vorliegenden Arbeit wurde somit erstmals die Wirkung des Interleukin-1β-converting-enzyme-Inhibitors Pralnacasan im akuten DSS-Modell untersucht. Es konnte die therapeutische Wirksamkeit von Pralnacasan belegt und ein Beitrag zum Verständnis der Rolle des Interleukin-1β-converting-enzymes sowie der Zytokine IL-1β und IL-18 im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen geleistet werden.

6. Literaturverzeichnis

Ajuebor, M. N. and M. G. Swain (2002). Role of chemokines and chemokine receptors in the gastrointestinal tract. *Immunology* **105**(2): 137-43.

Akita, K., T. Ohtsuki, Y. Nukada, T. Tanimoto, M. Namba, T. Okura, R. Takakura-Yamamoto, K. Torigoe, Y. Gu, M. S. S. Su, M. Fujii, M. Satoh-Itoh, K. Yamamoto, K. Kohno, M. Ikeda and M. Kurimoto (1997). Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin 18 in monocytic THP.1 cells. *J Biol Chem* **272**(42): 26595-603.

Araki, Y., A. Andoh, Y. Fujiyama and T. Bamba (2000). Development of dextran sulphate sodium-induced experimental colitis is suppressed in genetically mast cell-deficient Ws/Ws rats. *Clin Exp Immunol* **119**(2): 264-9.

Ashwell, S. (2001). Caspases: recent advances in small molecule inhibitors. *Expert Opin Ther Patents* **11**(10): 1593-1603.

Autenrieth, I. B., N. Bucheler, E. Bohn, G. Heinze and I. Horak (1997). Cytokine mRNA expression in intestinal tissue of interleukin-2 deficient mice with bowel inflammation. *Gut* **41**(6): 793-800.

Axelsson, L. G., E. Landstrom and A. C. Bylund-Fellenius (1998). Experimental colitis induced by dextran sulphate sodium in mice: beneficial effects of sulphasalazine and olsalazine. *Aliment Pharmacol Ther* **12**(9): 925-34.

Axelsson, L. G., E. Landstrom, T. J. Goldschmidt, A. Gronberg and A. C. Bylund-Fellenius (1996). Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. *Inflamm Res* **45**(4): 181-91.

Banks, C., A. Bateman, R. Payne, P. Johnson and N. Sheron (2003). Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pathol* **199**(1): 28-35.

Barbulescu, K., C. Becker, K. H. Meyer zum Buschenfelde and M. F. Neurath (1998). Regulation of protein-DNA interactions at the interferon-gamma gene promoter by corticosteroids. Implications for inflammatory bowel diseases. *Ann N Y Acad Sci* **859**: 194-7.

Brewington, R., M. Chatterji, M. Zoubine, R. N. Miranda, M. Norimatsu and A. Shnyra (2001). IFN-gamma-independent autocrine cytokine regulatory mechanism in reprogramming of macrophage responses to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* **167**(1): 392-8.

Cappello, M., S. Keshav, C. Prince, D. P. Jewell and S. Gordon (1992). Detection of mRNAs for macrophage products in inflammatory bowel disease by in situ hybridisation. *Gut* **33**(9): 1214-9.

Cassatella, M. A., S. Gasperini, F. Calzetti, A. Bertagnin, A. D. Luster and P. P. McDonald (1997). Regulated production of the interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils. *Eur J Immunol* **27**(1): 111-5.

Chikano, S., K. Sawada, T. Shimoyama, S. I. Kashiwamura, A. Sugihara, K. Sekikawa, N. Terada, K. Nakanishi and H. Okamura (2000). IL-18 and IL-12 induce intestinal inflammation and fatty liver in mice in an IFN-gamma dependent manner. *Gut* **47**(6): 779-86.

Coligan, J. E., A. M. Kruisbeck, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober (1992). In vitro assays for mouse lymphocyte function. Current protocols in immunology. New York, John Wiley & Sons, Inc. **1**.

Cominelli, F. and T. T. Pizarro (1996). Interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* **10 Suppl 2**: 49-53.

Cooper, H. S., S. N. Murthy, R. S. Shah and D. J. Sedergran (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* **69**(2): 238-49.

Dieleman, L. A., C. O. Elson, G. S. Tennyson and K. W. Beagley (1996). Kinetics of cytokine expression during healing of acute colitis in mice. *Am J Physiol* **271**(1 Pt 1): G130-6.

Dieleman, L. A., M. J. Palmen, H. Akol, E. Bloemena, A. S. Pena, S. G. Meuwissen and E. P. Van Rees (1998). Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* **114**(3): 385-91.

Dieleman, L. A., B. U. Ridwan, G. S. Tennyson, K. W. Beagley, R. P. Bucy and C. O. Elson (1994). Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* **107**(6): 1643-52.

Dinarello, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**(6): 2095-147.

Dinarello, C. A. (1999). Interleukin-18. *Methods* **19**(1): 121-32.

Duchmann, R., I. Kaiser, E. Hermann, W. Mayet, K. Ewe and K. H. Meyer zum Buschenfelde (1995). Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* **102**(3): 448-55.

Egger, B., F. Procaccino, I. Sarosi, J. Tolmos, M. W. Buchler and V. E. Eysselein (1999). Keratinocyte growth factor ameliorates dextran sodium sulfate colitis in mice. *Dig Dis Sci* **44**(4): 836-44.

Eigler, A., B. Siegmund, U. Emmerich, K. H. Baumann, G. Hartmann and S. Endres (1998). Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production. *J Leukoc Biol* **63**(1): 101-7.

Eigler, A., B. Sinha, G. Hartmann and S. Endres (1997). Taming TNF: Strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today* **18**(10): 487-92.

Fantuzzi, G. and C. A. Dinarello (1999). Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol* **19**(1): 1-11.

Fantuzzi, G., G. Ku, M. W. Harding, D. J. Livingston, J. D. Sipe, K. Kuida, R. A. Flavell and C. A. Dinarello (1997). Response to local inflammation of IL-1 beta-converting enzyme- deficient mice. *J Immunol* **158**(4): 1818-24.

Fantuzzi, G., A. J. Puren, M. W. Harding, D. J. Livingston and C. A. Dinarello (1998). Interleukin-18 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1beta-converting enzyme (caspase-1)-deficient mice. *Blood* **91**(6): 2118-25.

Fantuzzi, G., D. A. Reed and C. A. Dinarello (1999). IL-12-induced IFN-gamma is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor. *J Clin Invest* **104**(6): 761-7.

Fiocchi, C. (1998). Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* **115**(1): 182-205.

Gasperini, S., M. Marchi, F. Calzetti, C. Laudanna, L. Vicentini, H. Olsen, M. Murphy, F. Liao, J. Farber and M. A. Cassatella (1999). Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J Immunol* **162**(8): 4928-37.

Ghayur, T., S. Banerjee, M. Hugunin, D. Butler, L. Herzog, A. Carter, L. Quintal, L. Sekut, R. Talanian, M. Paskind, W. Wong, R. Kamen, D. Tracey and H. Allen (1997). Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* **386**(6625): 619-23.

Gu, Y., K. Kuida, H. Tsutsui, G. Ku, K. Hsiao, M. A. Fleming, N. Hayashi, K. Higashino, H. Okamura, K. Nakanishi, M. Kurimoto, T. Tanimoto, R. A. Flavell, V. Sato, M. W. Harding, D. J. Livingston and M. S. Su (1997). Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* **275**(5297): 206-9.

Hanauer, S. B., C. L. Wagner, M. Bala, L. Mayer, S. Travers, R. H. Diamond, A. Olson, W. Bao and P. Rutgeerts (2004). Incidence and importance of antibody responses to infliximab after maintenance or episodic treatment in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2**(7): 542-53.

Hans, W., J. Scholmerich, V. Gross and W. Falk (2000). Interleukin-12 induced interferon-gamma increases inflammation in acute dextran sulfate sodium induced colitis in mice. *Eur Cytokine Netw* **11**(1): 67-74.

Hartmann, G., C. Bidlingmaier, B. Siegmund, S. Albrich, J. Schulze, K. Tschoep, A. Eigler, H. A. Lehr and S. Endres (2000). Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **292**(1): 22-30.

Helwig, U., P. Gionchetti, F. Rizzello, K. Lammers, T. Kuhbacher, S. Schreiber, M. Baggiolini, M. Uguccioni and M. Campieri (2003). CXC and CC chemokine expression in inflamed and noninflamed pelvic ileal pouch tissue. *Int J Colorectal Dis*.

Hernandez, G. A. and C. B. Appleyard (2003). Bacterial load in animal models of acute and chronic 'reactivated' colitis. *Digestion* **67**(3): 161-9.

Hommes, D. W., T. Mikhajlova, S. Stoinov, D. Stimac, B. Vucelic, J. Lonovics, M. Zakuciova, G. D'Haens, G. Van Assche and T. Pearce (2004). Fontolizumab (Huzaf), a Humanized Anti-IFN-Gamma Antibody, Has Clinical Activity and Excellent Tolerability in Moderate to Severe Crohn's Disease. *Gastroenterology* **127**(1): 332.

Horai, R., S. Saijo, H. Tanioka, S. Nakae, K. Sudo, A. Okahara, T. Ikuse, M. Asano and Y. Iwakura (2000). Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med* **191**(2): 313-20.

Introna, M., R. C. Bast, Jr., C. S. Tannenbaum, T. A. Hamilton and D. O. Adams (1987). The effect of LPS on expression of the early "competence" genes JE and KC in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* **138**(11): 3891-6.

Kagnoff, M. F. and L. Eckmann (1997). Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* **100**(1): 6-10.

Kitajima, S., S. Takuma and M. Morimoto (1999). Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim* **48**(3): 137-43.

Koerner, T. J., T. A. Hamilton, M. Introna, C. S. Tannenbaum, R. C. Bast, Jr. and D. O. Adams (1987). The early competence genes JE and KC are differentially regulated in murine peritoneal macrophages in response to lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* **149**(3): 969-74.

Ku, G., B. S. Ford, S. A. Raybuck, M. W. Harding and J. C. R. Randle (2001). Selective Interleukin-1 converting enzyme (ICE/Caspase-1) inhibition with pralnacasan (HMR 3480/VX-740) reduces inflammation and joint destruction in murine type II collagen-induced arthritis (CIA). Am Coll Rheumatol, Abs 1134.

Kugathasan, S., S. L. Werlin, A. Martinez, M. T. Rivera, J. B. Heikenen and D. G. Binion (2000). Prolonged duration of response to infliximab in early but not late pediatric Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **95**(11): 3189-94.

Lehr, H. A., D. A. Mankoff, D. Corwin, G. Santeusanio and A. M. Gown (1997). Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression breast cancer. *J Histochem Cytochem* **45**: 1559-65.

Leonard, E. J. and T. Yoshimura (1990). Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* **11**(3): 97-101.

Leung-Toung, R., W. Li, T. F. Tam and K. Karimian (2002). Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a review. *Curr Med Chem* **9**(9): 979-1002.

Lindsay, J., C. Van Montfrans, F. Brennan, S. Van Deventer, P. Drillenburg, H. Hodgson, A. Te Velde and M. Sol Rodriguez Pena (2002). IL-10 gene therapy prevents TNBS-induced colitis. *Gene Ther* **9**(24): 1715-21.

Lindsay, J. O., A. Sandison, P. Cohen, F. M. Brennan and H. J. Hodgson (2004). IL-10 gene therapy is therapeutic for dextran sodium sulfate-induced murine colitis. *Dig Dis Sci* **49**(7-8): 1327-34.

Loher, F., K. Schmall, P. Freytag, N. Landauer, R. Hallwachs, C. Bauer, B. Siegmund, F. Rieder, H. A. Lehr, M. Dauer, J. F. Kapp, S. Endres and A. Eigler (2003). The specific type-4 phosphodiesterase inhibitor mesopram alleviates experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **305**(2): 549-56.

Ma, X. (2001). TNF-alpha and IL-12: a balancing act in macrophage functioning. *Microbes Infect* **3**(2): 121-9.

Mahida, Y. R. (2000). The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **6**(1): 21-33.

Mahida, Y. R., K. Wu and D. P. Jewell (1989). Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* **30**(6): 835-8.

McAlindon, M. E., C. J. Hawkey and Y. R. Mahida (1998). Expression of interleukin 1 beta and interleukin 1 beta converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. *Gut* **42**(2): 214-9.

Menten, P., A. Wuyts and J. Van Damme (2002). Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**(6): 455-81.

Monteleone, G., F. Trapasso, T. Parrello, L. Biancone, A. Stella, R. Iuliano, F. Luzza, A. Fusco and F. Pallone (1999). Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* **163**(1): 143-7.

Murch, S. H., C. P. Braegger, J. A. Walker-Smith and T. T. MacDonald (1993). Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* **34**(12): 1705-9.

Murthy, S., H. S. Cooper, H. Yoshitake, C. Meyer, C. J. Meyer and N. S. Murthy (1999). Combination therapy of pentoxifylline and TNFalpha monoclonal antibody in dextran sulphate-induced mouse colitis. *Aliment Pharmacol Ther* **13**(2): 251-60.

Murthy, S. N., H. S. Cooper, H. Shim, R. S. Shah, S. A. Ibrahim and D. J. Sedergran (1993). Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. *Dig Dis Sci* **38**(9): 1722-34.

Nakamura, S., T. Otani, Y. Ijiri, R. Motoda, M. Kurimoto and K. Orita (2000). IFN-gamma-dependent and -independent mechanisms in adverse effects caused by concomitant administration of IL-18 and IL-12. *J Immunol* **164**(6): 3330-6.

Netea, M. G., G. Fantuzzi, B. J. Kullberg, R. J. Stuyt, E. J. Pulido, R. C. McIntyre, Jr., L. A. Joosten, J. W. Van der Meer and C. A. Dinarello (2000). Neutralization of IL-18 reduces neutrophil tissue accumulation and protects mice against lethal Escherichia coli and Salmonella typhimurium endotoxemia. *J Immunol* **164**(5): 2644-9.

Neurath, M., I. Fuss and W. Strober (2000). TNBS-colitis. *Int Rev Immunol* **19**(1): 51-62.

Neurath, M. F., I. Fuss, B. L. Kelsall, E. Stuber and W. Strober (1995). Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* **182**(5): 1281-90.

Norman, J., J. Yang, G. Fink, G. Carter, G. Ku, W. Denham and D. Livingston (1997). Severity and mortality of experimental pancreatitis are dependent on interleukin-1 converting enzyme (ICE). *J Interferon Cytokine Research* **17**: 113-18.

Obermeier, F., G. Kojouharoff, W. Hans, J. Scholmerich, V. Gross and W. Falk (1999). Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* **116**(2): 238-45.

Ohmori, Y. and T. A. Hamilton (2001). Requirement for STAT1 in LPS-induced gene expression in macrophages. *J Leukoc Biol* **69**(4): 598-604.

Ohmori, Y., L. Wyner, S. Narumi, D. Armstrong, M. Stoler and T. A. Hamilton (1993). Tumor necrosis factor-alpha induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines in vivo. *Am J Pathol* **142**(3): 861-70.

Okamura, H., H. Tsutsui, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori, K. Akita, M. Namba, F. Tanabe, K. Konishi, S. Fukuda and M. Kurimoto (1995). Cloning of a new cytokine that induces IFN-γ production by T cells. *Nature* **378**: 88-91.

Okayasu, I., S. Hatakeyama, M. Yamada, T. Ohkusa, Y. Inagaki and R. Nakaya (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* **98**(3): 694-702.

Omata, N., M. Yasutomi, A. Yamada, H. Iwasaki, M. Mayumi and Y. Ohshima (2002). Monocyte chemoattractant protein-1 selectively inhibits the acquisition of CD40 ligand-dependent IL-12-producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response. *J Immunol* **169**(9): 4861-6.

Panes, J. (2001). Inflammatory bowel disease: pathogenesis and targets for therapeutic interventions. *Acta Physiol Scand* **173**(1): 159-65.

Parronchi, P., P. Romagnani, F. Annunziato, S. Sampognaro, A. Becchio, L. Giannarini, E. Maggi, C. Pupilli, F. Tonelli and S. Romagnani (1997). Type 1 T-helper cell

predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* **150**(3): 823-32.

Paszkowski, A. S., B. Rau, J. M. Mayer, P. Moller and H. G. Beger (2002). Therapeutic application of caspase 1/interleukin-1beta-converting enzyme inhibitor decreases the death rate in severe acute experimental pancreatitis. *Ann Surg* **235**(1): 68-76.

Pizarro, T. T., M. H. Michie, M. Bentz, J. Woraratanadharm, M. F. Smith, Jr., E. Foley, C. A. Moskaluk, S. J. Bickston and F. Cominelli (1999). IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* **162**(11): 6829-35.

Plevy, S. E., C. J. Landers, J. Prehn, N. M. Carramanzana, R. L. Deem, D. Shealy and S. R. Targan (1997). A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol* **159**(12): 6276-82.

Present, D. H., P. Rutgeerts, S. Targan, S. B. Hanauer, L. Mayer, R. A. van Hogezand, D. K. Podolsky, B. E. Sands, T. Braakman, K. L. DeWoody, T. F. Schaible and S. J. van Deventer (1999). Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* **340**(18): 1398-405.

Puspok, A., G. Oberhuber, J. Wyatt, T. Maier-Dobersberger, J. Hammer, F. Pfeffel, F. Wrba, R. Potzi and H. Vogelsang (1998). Gastroduodenal permeability in Crohn's disease. *Eur J Clin Invest* **28**(1): 67-71.

Renes, I. B., M. Verburg, D. J. Van Nispen, H. A. Buller, J. Dekker and A. W. Einerhand (2002 b). Distinct epithelial responses in experimental colitis: implications for ion uptake and mucosal protection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**(1): G169-79.

Renes, I. B., M. Verburg, D. J. Van Nispen, J. A. Taminiau, H. A. Buller, J. Dekker and A. W. Einerhand (2002 a). Epithelial proliferation, cell death, and gene expression in experimental colitis: alterations in carbonic anhydrase I, mucin MUC2, and trefoil factor 3 expression. *Int J Colorectal Dis* **17**(5): 317-26.

Rossetti, S., G. C. Actis, M. Fadda, M. Rizzetto and A. Palmo (2004). The use of the anti-tumour necrosis factor monoclonal antibody--infliximab--to treat ulcerative colitis: implications and trends beyond the available data. *Dig Liver Dis* **36**(6): 426-31.

Rudolphi, K., N. Gerwin, N. Verzijl, P. van der Kraan and W. van den Berg (2003). Pralnacasan, an inhibitor of interleukin-1beta converting enzyme, reduces joint damage in two murine models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **11**(10): 738-46.

Rumi, G., R. Tsubouchi, M. Okayama, S. Kato, G. Mozsik and K. Takeuchi (2004). Protective effect of lactulose on dextran sulfate sodium-induced colonic inflammation in rats. *Dig Dis Sci* **49**(9): 1466-72.

Sadlack, B., H. Merz, H. Schorle, A. Schimpl, A. C. Feller and I. Horak (1993). Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* **75**(2): 253-61.

Salas, A., M. Sans, A. Soriano, J. C. Reverter, D. C. Anderson, J. M. Pique and J. Panes (2000). Heparin attenuates TNF-alpha induced inflammatory response through a CD11b dependent mechanism. *Gut* **47**(1): 88-96.

Sandborn, W. J., S. B. Hanauer, S. Katz, M. Safdi, D. G. Wolf, R. D. Baerg, W. J. Tremaine, T. Johnson, N. N. Diehl and A. R. Zinsmeister (2001). Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* **121**(5): 1088-94.

Sandborn, W. J., C. J. Landers, W. J. Tremaine and S. R. Targan (1996). Association of antineutrophil cytoplasmic antibodies with resistance to treatment of left-sided ulcerative colitis: results of a pilot study. *Mayo Clin Proc* **71**(5): 431-6.

Sartor, R. B. (1995). Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am* **24**(3): 475-507.

Sasaki, T., S. Horiuchi, M. Yamazaki and S. Yui (1996). Stimulation of macrophage DNA synthesis by polyanionic substances through binding to the macrophage scavenger receptor. *Biol Pharm Bull* **19**(3): 449-55.

Schonbeck, U., F. Mach, J. Y. Bonnefoy, H. Loppnow, H. D. Flad and P. Libby (1997). Ligation of CD40 activates interleukin 1beta-converting enzyme (caspase-1) activity

in vascular smooth muscle and endothelial cells and promotes elaboration of active interleukin 1beta. *J Biol Chem* **272**(31): 19569-74.

Shintani, N., T. Nakajima, T. Okamoto, T. Kondo, N. Nakamura and T. Mayumi (1998). Involvement of CD4+ T cells in the development of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis and suppressive effect of IgG on their action. *Gen Pharmacol* **31**(3): 477-81.

Siegmund, B. (2002). Interleukin-1beta converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Biochem Pharmacol* **64**(1): 1-8.

Siegmund, B., A. Eigler, J. Moeller, T. F. Greten, G. Hartmann and S. Endres (1997). Suppression of tumor necrosis factor-alpha production by interleukin-10 is enhanced by cAMP-elevating agents. *Eur J Pharmacol* **321**(2): 231-9.

Siegmund, B., G. Fantuzzi, F. Rieder, F. Gamboni-Robertson, H. A. Lehr, G. Hartmann, C. A. Dinarello, S. Endres and A. Eigler (2001 a). Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**(4): R1264-73.

Siegmund, B., F. Rieder, S. Albrich, K. Wolf, C. Bidlingmaier, G. S. Firestein, D. Boyle, H. A. Lehr, F. Loher, G. Hartmann, S. Endres and A. Eigler (2001 b). Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **296**(1): 99-105.

Siegmund, B., J. Welsch, F. Loher, G. Meinhardt, B. Emmerich, S. Endres and A. Eigler (2001 c). Phosphodiesterase type 4 inhibitor suppresses expression of anti-apoptotic members of the Bcl-2 family in B-CLL cells and induces caspase-dependent apoptosis. *Leukemia* **15**(10): 1564-71.

Siegmund, B., H. A. Lehr, G. Fantuzzi and C. A. Dinarello (2001 d). IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23): 13249-54.

Sivakumar, P. V., G. M. Westrich, S. Kanaly, K. Garka, T. L. Born, J. M. Derry and J. L. Viney (2002). Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis: blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage. *Gut* **50**(6): 812-20.

Stallmach, A., B. Ludwig, S. C. Meuer and T. Giese (2002). IL-23- aber nicht IL-18-Transkripte sind bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöht. 57. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten., Bonn.

Stallmach, A. and M. Zeitz (2003). Immunsuppression bei Morbus Crohn: „Hit hard and early"– eine neue Therapiestrategie. *Deutsches Ärzteblatt* **100**: A 2787–2792 [Heft 43].

Stevceva, L., P. Pavli, A. Husband, A. Ramsay and W. F. Doe (2001). Dextran sulphate sodium-induced colitis is ameliorated in interleukin 4 deficient mice. *Genes Immun* **2**(6): 309-16.

Stevenson, F. T., F. Torrano, R. M. Locksley and D. H. Lovett (1992). Interleukin 1: the patterns of translation and intracellular distribution support alternative secretory mechanisms. *J Cell Physiol* **152**(2): 223-31.

Stoll, S., G. Muller, M. Kurimoto, J. Saloga, T. Tanimoto, H. Yamauchi, H. Okamura, J. Knop and A. H. Enk (1997). Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes. *J Immunol* **159**(1): 298-302.

Suzuki, R., H. Kohno, S. Sugie and T. Tanaka (2004). Sequential observations on the occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions in mouse colon treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* **95**(9): 721-7.

Takizawa, H., N. Shintani, M. Natsui, T. Sasakawa, H. Nakakubo, T. Nakajima and H. Asakura (1995). Activated immunocompetent cells in rat colitis mucosa induced by dextran sulfate sodium and not complete but partial suppression of colitis by FK506. *Digestion* **56**(3): 259-64.

Targan, S. R., S. B. Hanauer, S. J. van Deventer, L. Mayer, D. H. Present, T. Braakman, K. L. DeWoody, T. F. Schaible and P. J. Rutgeerts (1997). A short-term study of

chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* **337**(15): 1029-35.

Ten Hove, T., A. Corbaz, H. Amitai, S. Aloni, I. Belzer, P. Graber, P. Drillenburg, S. J. van Deventer, Y. Chvatchko and A. A. Te Velde (2001). Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF-alpha production in mice. *Gastroenterology* **121**(6): 1372-9.

Ten Hove, T., C. van Montfrans, M. P. Peppelenbosch and S. J. van Deventer (2002). Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* **50**(2): 206-11.

Tomoyose, M., K. Mitsuyama, H. Ishida, A. Toyonaga and K. Tanikawa (1998). Role of interleukin-10 in a murine model of dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scand J Gastroenterol* **33**(4): 435-40.

Ushio, S., M. Namba, T. Okura, K. Hattori, Y. Nukada, K. Akita, F. Tanabe, K. Konishi, M. Micallef, M. Fujii, K. Torigoe, T. Tanimoto, S. Fukuda, M. Ikeda, H. Okamura and M. Kurimoto (1996). Cloning of the cDNA for Human IFN-gamma-Inducing Factor, Expression in Escherichia coli, and Studies on the Biologic Activities of the Protein. *J Immunol* **156**: 4274-4279.

van Dullemen, H. M., S. J. van Deventer, D. W. Hommes, H. A. Bijl, J. Jansen, G. N. Tytgat and J. Woody (1995). Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* **109**(1): 129-35.

Venkatraman, A., B. S. Ramakrishna, A. B. Pulimood, S. Patra and S. Murthy (2000). Increased permeability in dextran sulphate colitis in rats: time course of development and effect of butyrate. *Scand J Gastroenterol* **35**(10): 1053-9.

Vertex Pharmaceuticals Inc., press release (2002). Phase IIa clinical trial results for pralnacasan in rheumatoid arthritis presented at ACR. http://www.vpharm.com/Pressreleases2002/pr102902.html

Via, C. S., A. Shustov, V. Rus, T. Lang, P. Nguyen and F. D. Finkelman (2001). In vivo neutralization of TNF-alpha promotes humoral autoimmunity by preventing the induction of CTL. *J Immunol* **167**(12): 6821-6.

Williams, D. A. (2001). Inflammatory cytokines and mucosal injury. *J Natl Cancer Inst Monogr*(29): 26-30.

Wilson, K. P., J. A. Black, J. A. Thomson, E. E. Kim, J. P. Griffith, M. A. Navia, M. A. Murcko, S. P. Chambers, R. A. Aldape, S. A. Raybuck and et al. (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **370**(6487): 270-5.

Wolfe, F. and K. Michaud (2004). Lymphoma in rheumatoid arthritis: the effect of methotrexate and anti-tumor necrosis factor therapy in 18,572 patients. *Arthritis Rheum* **50**(6): 1740-51.

Wyatt, J., G. Oberhuber, S. Pongratz, A. Puspok, G. Moser, G. Novacek, H. Lochs and H. Vogelsang (1997). Increased gastric and intestinal permeability in patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **92**(10): 1891-6.

Wyatt, J., H. Vogelsang, W. Hubl, T. Waldhoer and H. Lochs (1993). Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* **341**(8858): 1437-9.

Young, J. L., G. K. Sukhova, D. Foster, W. Kisiel, P. Libby and U. Schonbeck (2000). The serpin proteinase inhibitor 9 is an endogenous inhibitor of interleukin 1beta-converting enzyme (caspase-1) activity in human vascular smooth muscle cells. *J Exp Med* **191**(9): 1535-44.

Yuan, Y. H., T. ten Hove, F. O. The, J. F. Slors, S. J. van Deventer and A. A. te Velde (2001). Chemokine receptor CXCR3 expression in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **7**(4): 281-6.

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

bp	Basenpaare
bid	*bis in die*
cDNA	komplementäre DNA
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
Da	Dalton, Einheit der molekularen Masse
DNA	2´-Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dextran-Sulfat-Sodium
dNTP	2´-Desoxynukleosid 5´-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence-activated-cell-sorting
FCS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
HEC	Hydroxyethylcellulose
HEPES	N-2-Hydroxyehtylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
ICE	IL-1β-converting-enzyme
i.p.	Intraperitoneal
IP-10	IFN-γ inducible protein-10
KC	Chemokin, auch bekannt als CXCL-1
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MIP-1α	Macrophage inflammatory protein-1α
M-MLV	Moloney murine leukaemia virus
MW	Molecular weight
mRNA	Messenger-RNA
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMA	Phorbal-12-myristate-13-acetate
p.o.	Peroral
RPMI-Medium	Rosewell Park Memorial Institute-Medium
RT	Reverse Transkriptase
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere Herrn Professor Dr. med. Stefan Endres möchte ich für die Aufnahme in sein Labor und die kontinuierliche Unterstützung über die vergangenen fünf Jahre hinweg danken. Ich habe es als Privileg empfunden, meine Doktorarbeit in einem Labor durchzuführen, dessen Klima von hohem wissenschaftlichem Anspruch und kollegialer Hilfsbereitschaft geprägt ist. Diese Atmosphäre ist bedingt durch die Arbeit aller Mitglieder der Abteilung. Herr PD Dr. med. Andreas Eigler hat meine Arbeit durch stete inhaltliche Diskussion vorangetrieben. Die Durchführung meines Laboraufenthaltes in Amsterdam verdanke ich seiner Anregung. Herr Dr. med. Florian Loher hat meine Arbeit in freundschaftlicher und kollegialer Art betreut. Herrn Dr. med. Marc Dauer danke ich für die Durchsicht diverser Manuskripte, Frau Dr. med. Nikola Landauer und Herrn Philipp Freytag für die Durchführung von Nachversuchen für gemeinsame Publikationen. Unsere MTA Frau Rosemarie Kiefl war an der Durchführung vieler Versuche beteiligt und war dabei stets eine Quelle unersetzlicher praktischer Ratschläge. Frau Dr. med. Kathrin Schmall hat mich freundschaftlich und uneigennützig in die Labortätigkeit eingearbeitet.

Mein Aufenthalt im Labor von Professor Sander van Deventer am Academic Medical Center in Amsterdam war eine außergewöhnliche wissenschaftliche Erfahrung. Herr Dr. med. Jan van den Brande hat mich in sein Team aufgenommen, mir ein vielversprechendes Projekt anvertraut und mich in die Methodik der Immunhistochemie sowie des Apoptosenachweises eingeführt. Frau Dr. rer. nat. Anja Te Velde betreute meine Arbeit an verschiedenen murinen Modellen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Herrn Dr. med. Mikael Voskuil danke ich für die Bereitstellung der MCP-1-Knockout-Tiere. Die Deutsche Morbus Crohn / Colitis ulcerosa Vereinigung e.V. leistete großzügige finanzielle Unterstützung für mein Projekt in Amsterdam und ermöglichte mir so zu einem frühen Zeitpunkt eigenständiges wissenschaftliches Arbeiten.

Nicht zuletzt möchte ich allen danken, die mir privat ein Umfeld geschaffen haben, ohne das diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Publikationen

A. Originalarbeiten

1. Loher F, Schmall K, Freytag P, Landauer N, Hallwachs R, **Bauer C**, Siegmund B, Rieder F, Lehr HA, Dauer M, Kapp JF, Endres S, Eigler A (2003). The specific type 4 phosphodiesterase inhibitor mesopram alleviates experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **305**(2):549-56. (J.I.F. = 4,3).

2. Van den Brande JM, Braat H, van den Brink GR, Versteeg HH, **Bauer CA**, Hoedemaeker I, van Montfrans C, Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. (2003). Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **124**(7):1774-85. (J.I.F. = 12,7)

3. Loher F#, **Bauer C#**, Schmall K, Siegmund B, Dauer M, Lehr HA, Schönharting M, Endres S and Eigler A (2004). The interleukin-1-beta-converting-enzyme-inhibitor pralnacasan reduces dextran-sulfate-sodium-induced murine colitis and T helper 1 T-cell-activation. *J Pharmacol Exp Ther* **308**(2):583-90. (J.I.F. = 4,3).
# both authors contributed equally.

4. Dauer M, Herten J, **Bauer C**, Schad K, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Chemosensitization of pancreatic carcinoma cells to enhance T-cell-mediated cytotoxicity induced by tumor lysate-pulsed dendritic cells, J Immunother, 2005, in press. (J.I.F. = 3,9)

5. Dauer M, Schad K, Herten J, **Bauer C**, Kiefl R, Endres S, Eigler A. FastDC derived from human monocytes within 48 hours effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells, J Immunol Methods, 2005, in revision. (J.I.F. = 2,7)

6. **Bauer C**, Loher F, Dauer M, Lehr HA, Schönharting M, Endres S and Eigler A: The ICE-inhibitor pralnacasan reduces IFN-γ-levels and suppresses IP-10-mRNA-expression, Manuskript in Vorbereitung.

B. Vorträge

1. "Pralnacasan lindert die DSS-induzierte murine Kolitis". Gastroenterologisches Kolloquium, Medizinische Klinik Innenstadt, LMU München, November 2001.

2. "Der IL-1β-converting-enzyme-Inhibitor Pralnacasan lindert die DSS-induzierte murine Kolitis und reduziert die Th1 Antwort". 57. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten in Bonn, 12. September 2002.

C. Abstracts

1. Loher F, Schmall K, Siegmund B, **Bauer C**, Lehr HA, Dauer M, Kapp JF, Endres S, Eigler A. In vivo efficacy of the specific type 4 phosphodiesterase inhibitor mesopram in DSS-induced murine colitis. Digestive Disease Week 2001, Atlanta, May 20-23, 2001.

2. Loher F, Schmall K, Siegmund B, Rieder F, **Bauer C**, Lehr HA, Wehner V, Schönharting M, Endres S, Eigler A. Amelioration of DSS-induced murine colitis by blockade

of the integrin adhesion molecule VLA4. VI International Symposium on Inflammatory Bowel Diseases, Istanbul, September 3-5, 2001.

3. **Bauer C**, Loher F, Schmall K, Siegmund B, Dauer M, Lehr HA, Schönharting M, Endres S, Eigler A. The ICE inhibitor pralnacasan reduces DSS-induced murine colitis and Th1-cell activation. VI International Symposium on Inflammatory Bowel Diseases, Istanbul, September 3-5, 2001.

4. **Bauer C**, Loher F, Schmall K, Hallwachs R, Siegmund B, Dauer M, Freytag P, Lehr HA, Schönharting M, Endres S, Eigler A. *In vivo* efficacy of the IL-1β-converting-enzyme-inhibitor pralnacasan in DSS-induced colitis. Digestive Disease Week 2002, San Fransisco, May 19-22, 2002.

5. **Bauer C**, Voskuil M, van den Brande J, ten Cate H, Te Velde A, van Deventer S. MCP-1 (-/-) mice are more susceptile to DSS-induced colitis. A protective effect of MCP-1. Digestive Disease Week 2003, Orlando, May 17-22, 2003.

6. **Bauer C**, Loher F, Dauer M, Lehr HA, Schönharting M, Endres S, Eigler A. Induction but not progression of DSS-induced colitis. Digestive Disease Week 2003, Orlando, May 17-22, 2003.

7. van den Brande J, Braat H, **Bauer C**, Peppelenbosch M, van Deventer S, Hommes D. Methotrexate and Infliximab act synergistically by inducing enhanced apoptosis in activated human lymphocytes. Digestive Disease Week 2003, Orlando, May 17-22, 2003.

8. **Bauer C**, Dauer M, Herten J, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Cyclooxygenase-2-inhibitors induce the expression of CD95 and sensitize pancreatic carcinoma cells to cytotoxic T-cell responses induced by tumor-lysate-pulsed dendritic cells. 8th International Symposium on Dendritic Cells. Brügge, Belgien, 17. – 21. Oktober 2004.

9. **Bauer C**, Bauernfeind F, Dauer M, Herten J, Renner F, Schnurr M, Endres S, Eigler A. COX-2-Inhibitoren sensitivieren Pankreaskarzinomzellen gegenüber Apoptoseinduktion durch Hitze und CD95-Aktivierung, 111. Internistenkongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden, 2. – 6. April 2005.

10. Dauer M, Herten J, **Bauer C**, Schnurr M, Endres S, Heldwein W, Eigler A. Zelluläre Immuntherapie des Pankreaskarzinoms mit dendritischen Zellen: Evaluation synergistisch wirksamer pharmakologischer Therapiestrategien *in vitro*, 111. Internistenkongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden, 2. – 6. April 2005.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Christian Alexander Bauer
Geburtsdatum	9. Dezember 1976
Geburtsort	München
Eltern	Dr. med. Bernd Bauer, Orthopäde und Chirurg Dr. med. Evelyn Bauer, Kinderärztin
Familienstatus	ledig

Schulzeit, Wehrdienst und Studium

1987 bis 1996	Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Max-Planck-Gymnasiums in München Pasing
Juni 1996	Abitur (Note: 1,0)
1996 bis 1997	Wehrdienst: Gebirgsjägerbatallion Mittenwald
Mai 1997	Beginn des Studiums der Geschichte an der LMU München
Oktober 1997	Beginn des Studiums der Medizin an der LMU München
September 1999	Ärztliche Vorprüfung (Note „gut“)
August 2000	Erstes Medizinisches Staatsexamen (Note „gut“)
Januar 2002	Erstes Amerikanisches Staatsexamen
März 2002	Magisterarbeit an der Abteilung für Frühe Neuzeit des Historicums der LMU München, Thema: Die wissenschaftliche Revolution und die Rolle des Andreas Vesal (Note „sehr gut“)
Juli 2002	Magister artium der Ludwig-Maximilians-Universität München (Gesamtnote „sehr gut“)
März 2003	Zweites Medizinisches Staatsexamen (Note „gut“)
April 2004	Drittes Medizinisches Staatsexamen (Note „gut“)

<u>Famulaturen</u>

- Kreiskrankenhaus Fürstenfeldbruck
- Nepean Hospital Penrith, Western Clinical School, University of Sydney
- Friedrich-Baur-Institut zur Behandlung und Erforschung entzündlicher Nervenkrankheiten, LMU München
- Children´s Hospital, Pritzker Medical School, University of Chicago

<u>Praktisches Jahr</u>

- Innere Medizin am Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA
- Chirurgie am Klinikum Großhadern, LMU München
- Neurologie am Hôpital Cantonal Universitaire de Genève, Clinique de Neurologie, Genf

Klinische Tätigkeit

Mai bis Oktober 2004 **Arzt im Praktikum** an der Medizinischen Klinik Innenstadt, Klinikum der Universität München
Mitglied der Arbeitsgruppe „Gastroenterologische Immuntherapie“ unter PD Dr. Andreas Eigler

seit Oktober 2004 **Assistent der Medizinischen Klinik Innenstadt**, Klinikum der Universität München, Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Forschung

2000 bis 2004 **Promotionsarbeit** in der Abteilung Klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik, LMU München, Leiter: Prof. Stefan Endres

September 2002 **Ausbildungsstipendiumsstipendium “Junge Wissenschaft”** der Deutschen Morbus Crohn / Colitis ulcerosa Vereinigung DCCV

September bis November 2002
Forschungsaufenthalt im Laboratory for Experimental Internal Medicine, **Academic Medical Center, University of Amsterdam**
Leiter: Professor S. J. van Deventer, Tätigkeit im Bereich des immunhistochemischen Apotosenachweises

Lehre

- Teilnahme am PJ-Programm der Harvard-Munich-Alliance for Medical Education in Boston
- Tutor des KVK-Kurses WS 2003/04 im Rahmen des Harvard-Programms der LMU München

Außeruniversitäre Tätigkeiten

1999 bis 2001 **Stipendiat der Hanns-Seidel-Stiftung**

2001 bis 2004 **Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes**