

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
Zentrum für Innere Medizin
I. Medizinische Klinik und Poliklinik (Gastroenterologie mit Sektionen
Infektiologie und Tropenmedizin)

Direktor:
Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse

Die Auswirkungen von Thalidomid auf das Mdr2-KO Mausmodell der Primär Sklerosierenden Cholangitis

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin /Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Markus Sturm
geboren in Heidelberg

Hamburg 2019

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.12.2019**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Christoph Schramm

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Primär Sklerosierende Cholangitis	6
1.2 Thalidomid	11
1.3 Mdr2-KO Mäuse	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Geräte	14
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	15
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	16
2.1.4 Immunhistochemie	17
2.1.5 Primer.....	18
2.1.5.1 Primer PCR.....	18
2.1.5.2 Primer qt RT-PCR.....	18
2.1.6 Puffer.....	19
2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	19
2.2.1.1 Zucht und Erhaltung transgener Mauslinien.....	19
2.2.1.2 DNA Isolation und Aufreinigung	19
2.2.1.3 PCR	20
2.2.1.4 Gelelektrophorese.....	20
2.2.2 Tierversuche.....	21
2.2.2.1 Verum und Kontrolle	21
2.2.2.2 Kurzzeitexperiment	21
2.2.2.3 Langzeitexperiment.....	21
2.2.2.4 Blutentnahme.....	21

2.2.2.5 Leberentnahme zur RNA Isolation	22
2.2.2.6 Leberentnahme zur histologischen Untersuchung	22
2.2.3 Messung der Lebertransaminasen	22
2.2.4 Genexpressionsanalyse	22
2.2.4.1 RNA Isolation aus Lebergewebe.....	22
2.2.4.2 RNA Konzentrationsbestimmung	23
2.2.4.3 cDNA Synthese.....	23
2.2.4.4 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion.....	23
2.2.5 Immunhistochemie	24
2.2.5.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	24
2.2.5.2 Sirius Rot Färbung	24
2.2.5.3 Sirius Rot Auswertung.....	25
2.2.5.4 F 4/80 Färbung.....	25
2.2.5.5 F 4/80 Auswertung	26
2.2.5.6 Untersuchung auf Dysplasien.....	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Kurzzeitexperiment.....	27
3.1.1 Lebertransaminasen.....	29
3.1.2 Auswirkung von Thalidomid auf die Genexpression.....	29
3.2 Langzeitexperiment	32
3.2.1 Lebertransaminasen.....	33
3.2.2 Sirius Rot.....	34
3.2.2 F 4/80 Färbung.....	35
3.2.3 Dysplasien.....	36
4 Diskussion	37

5 Zusammenfassung	45
6 Abkürzungsverzeichnis	45
7 Literaturverzeichnis	49
8 Danksagung	61
9 Lebenslauf	62
10 Eidesstattliche Erklärung	62

1 Einleitung

1.1 Primär Sklerosierende Cholangitis

Die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC) ist eine chronische cholestatische Erkrankung der Leber. Sie ist charakterisiert durch eine progressive Entzündung und Fibrose der intra- und extrahepatischen Gallengänge (Singh & Talwalkar 2013). Histologisch zeigt sich dies in Form einer konzentrischen periduktalen Fibrose, dem für die Primär Sklerosierenden Cholangitis charakteristischen Bild der „Onion Skins“. Die daraus resultierenden Stenosen der Gallengänge und die damit einhergehende Schädigung des Lebergewebes führen beim Großteil der Patienten zu Zirrhose und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Leber-, Gallengangs- und Pankreaskarzinomen (Schrumpf & Boberg 2003). Die Prävalenz der Erkrankung liegt in Nordamerika und Europa bei 6-16 pro 100.000 Einwohnern (Bambha et al. 2003; Lindkvist et al. 2010; Molodecky et al. 2011; Boonstra et al. 2013). Männer sind fast doppelt so häufig betroffen wie Frauen und das durchschnittliche Alter bei Erkrankung liegt bei 41 Jahren (Molodecky et al. 2011; Boonstra et al. 2013). Die einzig bekannten Risikofaktoren für die Primär Sklerosierende Cholangitis sind das männliche Geschlecht, eine chronisch entzündliche Darmerkrankung sowie ein Verwandter ersten Grades, der an Primär Sklerosierender Cholangitis erkrankt ist. Bei 60-80% der Patienten liegt zusätzlich eine chronisch entzündliche Darmerkrankung vor (Broomé et al. 1996; Chapman et al. 1980). Tabakkonsum scheint eine protektive Wirkung zu haben (Terg et al. 2008; Loftus et al. 1996; Bergquist et al. 2005). Die ersten Symptome der Krankheit sind meist Müdigkeit und Pruritus, später können Ikterus, Gewichtsverlust und abdominelle Schmerzen hinzukommen. Ein Großteil der Patienten (44-56%) zeigt sich zum Zeitpunkt der Diagnose asymptomatisch, so dass die Diagnose über laborchemische Auffälligkeiten im Rahmen von Routineuntersuchungen gestellt wird (Singh & Talwalkar 2013). Die Patienten zeigen häufig erhöhte Werte der Alkalischen Phosphatase im Serum, die Bilirubin Werte im Serum sind zum Zeitpunkt der Diagnose jedoch häufig (70%) unauffällig (Chapman et al. 1980). 60% der Patienten zeigten erhöhte Ig-G, 45% erhöhte Ig-M Werte (Chapman et al. 1980; Boberg et al. 1996). Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis weisen erhöhte Level diverser Autoantikörper auf. 63% zeigen erhöhte Anti-BEC, 26-94% erhöhte pANCA, 8-77% erhöhte ANA und 5-83% erhöhte SMA Spiegel (Hov et al. 2008).

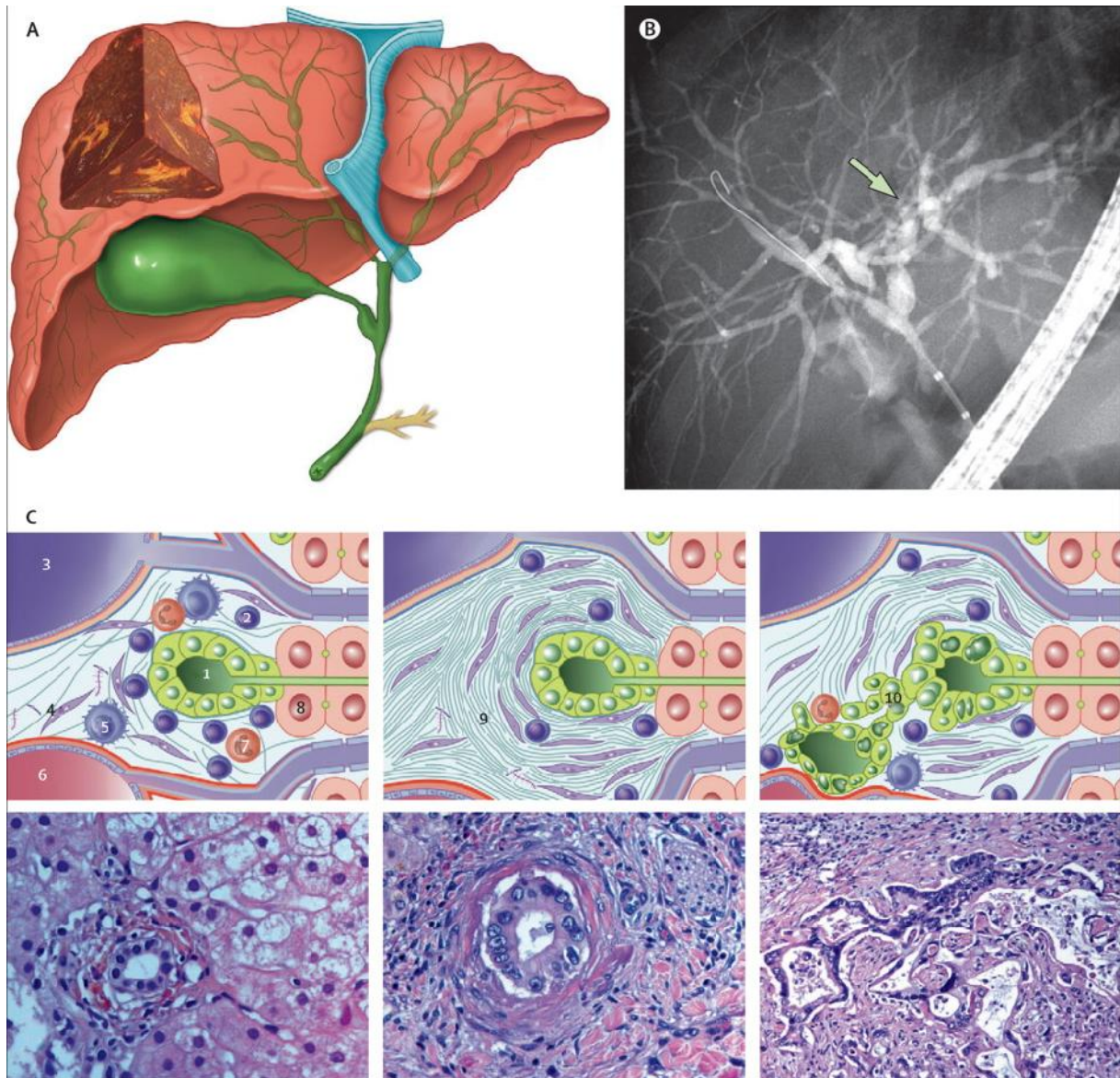


Abb. 1: Pathologische Veränderungen bei Primär Sklerosierender Cholangitis

(A) Multifokale Strikturen der intra- und extrahepatischen im Wechsel mit dilatierten Abschnitten führen zum für die Primär Sklerosierende Cholangitis charakteristischen Bild der „Perlschnur“. **(B) Die ERCP ist der Goldstandard zur Diagnosestellung der Primär Sklerosierenden Cholangitis.** **(C) Im frühen Stadium der Erkrankung zeigen sich nur leichte Veränderungen des Epithels mit Einwanderung von Lymphozyten. Die zwiebelschalenartige konzentrische periduktale Fibrose ist das histologische Charakteristikum der Primär Sklerosierenden Cholangitis. In ca. 15% der Patienten entwickelt sich aus dem stark veränderten Epithel der Gallengänge ein Cholangiokarzinom (Schrumpf & Boberg 2003).** 1=Gallengang, 2=Lymphozyt, 3=Portalvene, 4=Fibroblast, 5=Markophage, 6=Arterie, 7=Neutrophiler Granulozyt, 8=Hepatozyt, 9=Kollagen, 10=Cholangiokarzinom. Hirschfield et al, The Lancet 2013.

Goldstandard zur Sicherung der Diagnose ist die Durchführung einer endoskopisch retrograden Cholangiopankreatikographie (ERCP) oder einer Magnetresonanz

Cholangiopankreatikographie (MRCP). Es zeigen sich multifokale Strikturen der intra- und extrahepatischen Gallengänge; die dazwischen liegenden Abschnitte sind dilatiert. Dieses „perlschnurartige“ Bild der Gallengänge ist typisch für die Primär Sklerosierende Cholangitis (MacCarty et al. 1983). Patienten, die eine für die Primär Sklerosierende Cholangitis typische Klinik haben, jedoch nicht die passenden Veränderungen der Gallengänge in der MRCP und ERCP zeigen, können eine Variante der Primär Sklerosierenden Cholangitis, die small-duct Primär Sklerosierende Cholangitis, haben. Diese Diagnose kann durch eine Leberbiopsie gesichert werden, da auch bei der small-duct Variante die typische Histologie der Primär Sklerosierenden Cholangitis vorliegt.

Es gibt derzeit keine kurative Therapie der Primär Sklerosierenden Cholangitis. Ursodeoxy-Cholsäure (UDCA) wird häufig zur Therapie eingesetzt, allerdings ist die Wirksamkeit umstritten. Während manche Studien zeigten, dass die hochdosierte Therapie mit Ursodeoxy-Cholsäure zu einer Verbesserung der Leberblutwerte und des Mayo-Risiko-Scores führt und eine Verringerung des Risikos für Cholangiokarzinome und Kolorektalkarzinome bei assoziierter chronisch entzündlicher Darmerkrankung diskutiert wurden, zeigten andere Studien keine Vorteile der Therapie (Olsson et al. 2005; Lindström et al. 2012; Rudolph et al. 2007; Cullen et al. 2008). Aktuelle Metaanalysen, die der Frage der Wirksamkeit einer Ursodeoxy-Cholsäure-Therapie nachgingen, konnten keinen signifikanten Vorteil der Therapie zeigen (Triantos et al. 2011; Poropat et al. 2011). Immunsuppressiva und Immunmodulatoren zeigen keine Verbesserung der Krankheitsaktivität und Prognose (Hospital 2005). Die Lebertransplantation ist die einzige kurative Behandlung bei PSC-Patienten mit Leberzirrhose. Die Fünf-Jahres Überlebensrate nach erfolgreicher Lebertransplantation liegt bei ca. 90%. Bei 10-20% der Patienten tritt die Primär Sklerosierende Cholangitis jedoch auch nach der Transplantation wieder auf. (Sekido et al. 1999) Die durchschnittliche Überlebensdauer nach Diagnose beträgt 12 bis 17 Jahre (LaRusso et al. 2006). Hier gibt es jedoch große individuelle Unterschiede, weshalb sich zur Abschätzung der individuellen Lebenserwartung verschiedene Scores etabliert, welche die Patienten unter Berücksichtigung des Alters, der Bilirubin-, Lebertransaminasen- und Albuminspiegel und anderer Parameter in verschiedene Risikoklassen einteilen (Kim et al. 1999).

Die Pathogenese der Primär Sklerosierenden Cholangitis ist zu großen Teilen unbekannt. Dass die Primär Sklerosierende Cholangitis beim Großteil der Patienten in

Verbindung mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung vorliegt, legt nahe, dass es sich bei der Primär Sklerosierenden Cholangitis, wie bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, weniger um eine klassische Autoimmunerkrankung handelt, als vielmehr um eine abnorme Antwort des angeborenen Immunsystems auf Antigene aus der Darmflora, die dann eine Aktivierung der spezifischen Immunantwort nach sich zieht. Diese Annahme wird dadurch bekräftigt, dass – untypisch für Autoimmunkrankheiten – Männer häufiger von Primär Sklerosierender Cholangitis betroffen sind als Frauen und es bis heute kein definiertes pathogenes Autoantigen gibt (Aron & Bowlus 2009).

Es gibt unterschiedliche Hypothesen zur Pathogenese der Primär Sklerosierenden Cholangitis, doch obwohl es Beweise für Teile aller dieser Modelle gibt, lassen sie sich bisher nicht in Einklang bringen.

Das Modell Vierlings und O'Mahonys, die „abberant gut lymphocyte homing“-Hypothese, geht davon aus, dass zuerst eine Aktivierung von Cholangiozyten durch bakterielle Pathogene aus dem Darm stattfindet, welche dann bereits im Darm aktivierte T-Zellen in die Leber rekrutieren und proinflammatorische Zytokine und Zelladhäsionsmoleküle produzieren, was zu chronischer Entzündung, Fibrose und Atrophie der Gallengänge und im Verlauf zu Strikturen, Cholestase und schließlich Zirrhose führt (O'Mahony & Vierling 2006). Zudem konnte bei Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis nachgewiesen werden, dass darmtypische Zytokine und Zelladhäsionsmoleküle in der Leber exprimiert werden. Wie es dazu kommt bleibt allerdings unklar (Eksteen et al. 2004; Grant et al. 2001).

Eine andere Hypothese zur Entstehung der Krankheit sieht die Primär Sklerosierende Cholangitis als extraintestinale Komplikation der chronisch entzündlichen Darmkrankheiten – die „leaky gut“ Hypothese. Demnach führt eine Barrierestörung des Darmepithels zum Übertritt bakterieller Strukturen in das Pfortaderblut. Diskutiert wird zudem auch eine bakterielle Besiedlung des Pfortadersystems. Die Exposition mit mikrobiellen Antigenen bringt Cholangiozyten zur Produktion proinflammatorischer Zytokine. Dies wiederum lockt Lymphozyten an, welche sich in den periportalen Feldern ansiedeln und ihrerseits auch chemotaktisch tätig werden. Dies führt zu einer chronischen Entzündung und konsekutiven Fibrose des hepatobiliären Systems. Diese Hypothese wird zum einen dadurch gestützt, dass Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis häufig an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

leiden (die mit Barrierestörungen des Darmes einhergehen) und umgekehrt. Zudem konnten in den Lebern betroffener Patienten bakterielle Strukturen nachgewiesen werden (Krasinskas et al. 2007; Ponsioen et al. 2002; Olsson et al. 1998).

Die „toxic bile“- Hypothese geht davon aus, dass eine veränderte Zusammensetzung der Galle über toxische Wirkungen die Entzündung und Fibrose in der Leber verursacht.

Ein ähnlicher, relativ neuer Denkansatz sieht die Pathogenese der Primär Sklerosierenden Cholangitis als eine Art „Arteriosklerose der Gallengänge“. Eine Übersättigung der Galle mit Cholesterin soll zu Oxidations- und nachfolgenden Entzündungsprozessen um die Gallengänge führen, ähnlich dem Pathomechanismus der Arteriosklerose, bei dem Ablagerung und Oxidation von LDL-Cholesterin in den Gefäßwänden zu Entzündung und Sklerose führen (Fickert et al. 2007).

Einig ist man sich jedoch darüber, dass der Entstehung der Primär Sklerosierenden Cholangitis eine multifaktorielle Genese zu Grunde liegt.

Genetische Faktoren scheinen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Primär Sklerosierenden Cholangitis zu spielen. Es wurden bei genomweiten Assoziationsstudien 23 Genloki identifiziert, die mit dem Erkrankungsrisiko korrelieren (Ji et al. 2016).

Auch Dysbalancen im Mikrobiom des Darmes und die Rezirkulation bakterieller Bestandteile im enterohepatischen Kreislauf scheinen ein wichtiger Faktor bei der Entstehung hepatobiliärer Entzündung zu sein. Dies konnte in einigen Tierversuchen nachgewiesen werden (Haruta et al. 2010; Lichtman et al. 1991; Yamada et al. 1994). Tatsächlich zeigte sich in einigen Studien eine positive Wirkung von Antibiotika bei Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis. So zeigte die zwölfwöchige Gabe von Vancomycin in einer Pilotstudie eine signifikante Verbesserung des Mayo-Scores, der Leberblutwerte und der Symptomatik der Patienten (Azizi et al. 2016). Eine Phase-III Studie hierzu hat bereits begonnen (Clinical-Trials.gov NCT01802073).

Wie bereits erwähnt zeigten Therapieversuche mit Immunsuppressiva und -modulatoren wie Kortikosteroiden, Methotrexat und Tacrolimus außer in Ausnahmefällen keine Erfolge (Hospital 2005). Aktuell werden Studien zur Therapie mit antifibrotischen Medikamenten bei Primär Sklerosierender Cholangitis durchgeführt. Das Enzym Lysyl Oxidase-Like 2 (Loxl2) spielt eine wichtige Rolle bei

der Regulation der Synthese und Vernetzung der Extrazellulärmatrix (Barry-Hamilton et al. 2010). Die Wirkung der Inhibition dieses Enzyms durch den monoklonalen Antikörper Simtuzumab bei Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis wird derzeit in einer Phase-II Studie untersucht (Clinical-Trials.gov NCT01802073). Obeticholsäure ist ein Gallensäureanalogon, dem über den Farnesoid-X Rezeptor (FXR) antifibrotische Wirkung zugesprochen wird. Klinische Studien zur Therapie mit Obeticholsäure bei nichtalkoholischer Steatohepatitis und Primär Biliärer Cholangitis zeigten positive Effekte (Neuschwander-Tetri et al. 2015; Hirschfield et al. 2015). Eine Studie zur Wirkung bei Primär Sklerosierender Cholangitis ist derzeit im Gange (Clinical-Trials.gov NCT02177136). Tretionin, ein Vitamin-A Derivat mit breit gefächerten immunmodulatorischen Eigenschaften zeigte im Tierversuch in Kombination mit Ursodeoxy-Cholsäure eine deutliche antifibrotische Wirkung (He et al. 2011). Eine Phase-I Studie zur Wirkung von Tretionin bei Primär Sklerosierender Cholangitis läuft derzeit (Clinical-Trials.gov NCT01456468). Vielversprechende Ergebnisse brachten Untersuchungen der Wirkung von 24-nor-Ursodeoxy-Cholsäure (24-nor-UDCA), einer modifizierten Gallensäure. Im Mausmodell konnte bei Mdr2-KO Mäusen gezeigt werden, dass die vierwöchige Gabe einer 24-nor-UDCA-haltigen Diät im Vergleich zu einer konventionellen UDCA-haltigen Diät sowohl histologisch als auch laborchemisch Entzündung und Fibrose zu hemmen vermochte (Fickert et al. 2006). Eine randomisierte kontrollierte Studie, die 161 Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis untersuchte, konnte zeigen, dass die Gabe von 24-nor-UDCA über zwölf Wochen gegenüber einem Placebo dosisabhängig eine signifikante Besserung der laborchemischen Leberparameter zeigte (Fickert et al. 2017). Eine Phase-III Studie zur weiteren Untersuchung der Effekte von 24-nor-UDCA ist in Gange (ClinicalTrials.gov NCT01755507).

Trotz vielversprechender Ansätze ist es bis heute nicht gelungen eine wirksame medikamentöse Therapie der Primär Sklerosierenden Cholangitis zu etablieren.

1.2 Thalidomid

Thalidomid wurde in den 1950er Jahren in Deutschland unter dem Namen Contergan von der Firma Grünenthal als Schlaf- und Beruhigungsmittel auf den Markt gebracht. Da es im Tierversuch auch in hohen Dosen keine toxische Wirkung zeigte und als risikoärmeres neues Sedativum beworben wurde, erlangte Contergan schnell große Popularität und wurde, da es auch eine antiemetische Wirkung besaß, bevorzugt bei

schwangeren Frauen eingesetzt. Im November 1961 wurde das Medikament in Deutschland vom Markt genommen, da sich Berichte über eine teratogene Wirkung des Medikaments häuften. Skandalcharakter entwickelten die Geschehnisse, als herauskam, dass bereits 1961 dem Hersteller Grünenthal 1.600 Warnungen über Fehlbildungen von Neugeborenen im Zusammenhang mit der Contergan-Einnahme der Mütter vorlagen. Weltweit sollen etwa 10.000 Kinder weltweit Schäden durch Contergan davongetragen haben, 7.000 davon allein in Deutschland (Anon n.d.).

Die chemische Bezeichnung von Thalidomid lautet α -Phthalimidoglutarimid. Es ist eine chirale Verbindung, bestehend aus dem (R)- und dem (S)-Enantiomer, die sich im menschlichen Körper rasch ineinander umwandeln. Es ist inzwischen gelungen, durch Deuterisierung die beiden Enantiomere zu stabilisieren und isolieren (Jacques et al. 2015). Dem (R)-Enantiomer wird die sedierende Wirkung von Thalidomid zugeschrieben während das (S)-Enantiomer als potenter Immunmodulator mit antiinflammatorischer und antiangiogenetischer Wirkung identifiziert wurde. Die genauen molekularen Wirkmechanismen sind noch unklar, es scheinen die Hemmung von TNF- α , IL-6, Interferonen und NF-kappa B eine wichtige Rolle zu spielen (Keifer et al. 2001; Moreira et al. 1993). Zudem konnte ein hemmender Effekt auf die Expression der COX-2 und damit einhergehend der Prostaglandinsynthese gezeigt werden, was eine Erklärung der antiangiogenetischen Wirkung des Thalidomids sein könnte (Fujita et al. 2001).

Durch seine antiinflammatorische und antiangiogenetische Wirkung und die – bis auf die nun bekannte Teratogenität – sehr geringen Nebenwirkungen ist Thalidomid sehr attraktiv zur Erforschung neuer Therapieansätze.

Thalidomid ist bereits als Therapeutikum des Erythema nodosum leprosum, einer kutanen Komplikation der Lepra und in der Kombinationstherapie des Multiplen Myeloms zugelassen.

Es zeigten sich in Studien vielversprechende Ansätze für die Therapie zahlreicher Krankheiten und Krebsarten. Es zeigte sich die Wirksamkeit von Thalidomid bei kutanen Verlaufsformen diverser Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, wie beispielsweise der Sarkoidose, des M. Behcet und des systemischen Lupus erythematoses (Wang et al. 2016; Lim et al. 2015; Carlesimo et al. 1995). Es ließen sich positive Ergebnisse in der Therapie des Prostata-, Nierenzell- und Kolonkarzinoms zeigen (Elaraj et al. n.d.; Figg et al. 2009; Govindarajan 2002). Des

Weiteren wird der Einsatz bei diversen HIV-assoziierten Erkrankungen wie dem Karposi-Sarkom erprobt (Little et al. 2000). Zudem wird der Einsatz von Thalidomid bei therapierefraktären Fällen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erprobt (Bramuzzo et al. 2016).

In den Pathomechanismen all dieser Erkrankungen spielen Entzündungsreaktionen und Angiogenese eine wichtige Rolle. Obwohl vieles über die Pathogenese der Primär Sklerosierenden Cholangitis weiterhin unklar ist, scheinen Entzündung und Angiogenese und später die Tumorentstehung auch hier eine wichtige Rolle zu spielen, was dazu einlädt, die Wirksamkeit von Thalidomid bei dieser Erkrankung genauer zu untersuchen.

Die antifibrotische und antiinflammatorische Wirkung von Thalidomid wurde bereits in mehreren verschiedenen Fibrosemodellen in Maus und Ratte gezeigt.

Tabata et al konnten zeigen, dass die Gabe von Thalidomid Bleomycin-induzierte Lungenschäden abschwächt (Tabata et al. 2007). Dies konnte auch in anderen Versuchen an Ratte und Maus bestätigt werden (Dong et al. 2017a; Dong et al. 2017b). Auch bei chemisch induzierter Peritonealfibrose konnte sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen ein verbessertes Outcome durch die orale Gabe von Thalidomid erzielt werden (Arai et al. 2011; Mondello et al. 2009). Für die vorliegende Studie am Interessantesten ist die Arbeit von Lv et al, die zeigen konnten, dass sich bei Ratten mit chemisch induzierter Leberfibrose das histologische Bild und Fibroseparameter wie der Hydroxyprolin-Gehalt des Lebergewebes unter sechswöchiger Gabe von Thalidomid deutlich besserten (Lv et al. 2007). In den Versuchen wurde mit Thalidomiddosen um die 100 mg/kg Körpergewicht 3-7/wöchentlich bei oraler Gabe die besten Ergebnisse erzielt, sodass wir uns für eine Dosierung von 100 mg/kg Körpergewicht 5/wöchentlich entschieden (Mondello et al. 2009; Arai et al. 2011).

1.3 Mdr2-KO Mäuse

Das murine Multi-Drug-Resistance 2 (Mdr2) Gen kodiert einen ABC-Transporter in der Zellmembran von Hepatozyten. Seine Aufgabe ist der Transport von Phospholipiden aus dem Zellinneren in die Gallenkanälchen. Mäuse mit einem homozygoten Knockout des Mdr2 Gens können keine Phospholipide in die Galle sezernieren. Die veränderte Zusammensetzung der Galle führt zu toxischen Schädigungen der Gallenwege mit Ausbildung einer Cholangitis mit Gallengangsproliferation und entzündlicher Infiltration

und fortschreitender Fibrose der Portalfelder, deren makroskopische und histologische Erscheinung dem Bild der Primär Sklerosierenden Cholangitis beim Menschen sehr ähnelt (Smit et al. 1993; Mauad et al. 1994). Das Krankheitsbild manifestiert sich innerhalb weniger Wochen nach der Geburt, verläuft progredient und führt bereits nach drei Monaten zum Endstadium mit periportal Entzündung, Fibrose und duktaler Proliferation. Im Alter von vier bis sechs Monaten zeigen die Tiere erste dysplastische Vorstufen mit Ausbildung manifester, metastasierender Leberkarzinome im Verlauf. Aufgrund dieser Charakteristika hat sich das Mdr2-KO Mausmodell in der Erforschung medikamentöser Therapien der Primär Sklerosierenden Cholangitis etabliert (Popov et al. 2005a).

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Cobas Integra 400 plus analyzer	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
Gelelektrophoresekammer 41-2340	Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen
Mikroskop BZ-9000 Bioevo	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Mikrotom HM 335 E	Microm, Walldorf
Mixer & Rotator MX-S	DragonLab, Volksrepublik China
Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multipette XStream	Eppendorf, Hamburg
peqSTAR 2x Thermocycler	Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen
Pipetten (eppendorf Research plus)	Eppendorf, Hamburg
pipetus standard	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power Supply Model 1000/500	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
RealTimePCR System StepOnePlus	Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt

Spectrophotometer Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Tischzentrifuge	Sarstedt, Nümbrecht
Waage ME1002	Mettler-Toledo, Gießen
Wasserbad	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach
Zellkulturzentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5242-R	Eppendorf, Hamburg

2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
BSA	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid Rotipuran	Roth, Dauthphetal-Buchenau
dNTP Mix (2mM each)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Dream Taq DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Dream Taq Green Buffer 10x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
EDTA	Roth, Dauthphetal-Buchenau
Ethanol	Roth, Dauthphetal-Buchenau
FastRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit	Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt
Hydrogenchlorid	Roth, Dauthphetal-Buchenau
Hydroxypropylmethylcellulose	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Kapa Probe Fast qPCR Master Mix (2x)	Kapa Biosystems, Wilmington, Vereinigte Staaten von Amerika

Kapa Probe Fast ROX high (50x)	Kapa Biosystems, Wilmington, Vereinigte Staaten von Amerika
Methanol	Roth, Dauthphetal-Buchenau
Natriumchlorid	Roth, Dauthphetal-Buchenau
peqGOLD TriFast FL	Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen
PeqGREEN	Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen
Propanol Propan2-ol	Roth, Dauthphetal-Buchenau
Proteinase K	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
SDS	Roth, Dauthphetal-Buchenau
Thalidomid (+-) T144-100mg	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Trizma Base	Roth, Dauthphetal-Buchenau
Ultra Pure Agarose	Invitrogen, Carlsbad, Vereinigte Staaten von Amerika
Ultra Pure DEPC Treated Water	Invitrogen, Carlsbad, Vereinigte Staaten von Amerika
Wasserstoffperoxid 30%	Roth, Dauthphetal-Buchenau

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
BD Micro-Fine + U100 Insulinspritze 0,5 ml	BD Medical, Franklin Lakes, USA
Biopur Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht
Cellstar Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Cryo Pure Reaktionsgefäße 1,8 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen
Flaschen und andere Glaswaren	Schott AG, Mainz
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate (0,1 ml)	Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt
Mikropistille	Eppendorf, Hamburg
Mikrotom-Klingen S35	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Multipette Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg

Objektträger SuperFrost/Plus	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim
Omnifix-F Feindosierungsspritzen 1ml ohne Kanüle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 0,2 ml Multiply - µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml, Safe-Lock Tube	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 2,0 ml, Safe-Lock Tube	Eppendorf, Hamburg
Röhre 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Rotilabo Einbettkassetten grün und weiß, POM	Roth, Dautphetal-Buchenau
Scheren/Pinzetten	Fine Science Tools, Heidelberg
Schlundsonde	Fine Science Tools, Heidelberg
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.4. Immunhistochemie

Anti F4/80 [Cl: A3-1] Rat Monoclonal Antikörper (Order Nr ab6640)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland
Eukitt	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Färbemittel H.E	Roth, Dautphetal-Buchenau
Färbemittel Sirius Rot	Roth, Dautphetal-Buchenau
Goat Anti-Rat (H+L), Peroxidase-conjugated Antikörper (Order Nr 112-035-003)	Dianova GmbH, Hamburg
Goat Serum	Dako, Hamburg
Liquid DAB+Substrate Chromogen System	Dako, Hamburg
Paraformaldehyd	Roth, Dautphetal-Buchenau
Xylol	Roth, Dautphetal-Buchenau

2.1.5. Primer

2.1.5.1 Primer PCR

MDR2 WT forward	5' - GCT GAG ATG GAT CTT GAG - 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
MDR2 WT reverse	5' - GTC GAG TAG CCA GAT GAT GG - 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
MDR2 Neo forward	5' - TGT CAA GAC CGA CCT GTC CG - 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
MDR2 Neo reverse	5' - TAT TCG GCA AGC AGG CAT CG - 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg

2.1.5.2 Primer qt RT-PCR

NOS 2	Mm00440502_m1 Nos2	Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt
TNF	Mm00443258_m1 Tnf	Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt
TNFR SF 1	Mm00441889_m1 Tnfrsf1	Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt
GAPDH	Mm99999915_g1 Gapdh	Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt
LEPRE 1	Mm00498134_m1 Lepre1	Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt
IL 6	Mm00446190_m1 Il6	Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt
IL 1b	Mm00434228_m1 Il1b	Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt
CXCL 2	Mm00436450_m1 Cxcl2	Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt

2.1.6 Puffer

TE-Puffer

- 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
- 1 mM EDTA, pH 8,0

Tail-lysis Puffer

- 100 mM Tris/HCl, pH 8,5
- 5 mM EDTA
- 0,2% SDS
- 200 mM NaCl
- 50 µg/ml Proteinase K

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Alle hier geschilderten Tierversuche wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung G11/081 (21.08.2011 Hamburg) durchgeführt.

2.2.1.1 Zucht und Erhaltung transgener Mauslinien

Verwendet wurden Mdr2-KO Mäuse des Mausstammes FVB/N. Die Tiere wurden unter keimarmen Bedingungen bei konstanter Raumtemperatur (20°C) gehalten und erhielten Futter und Wasser ad libitum. Alle Tiere wurden per PCR und Gelelektrophorese genotypisiert.

2.2.1.2 DNA Isolation und Aufreinigung

Zur Isolation der murinen DNA wurden Schwanzspitzenbiopsien verwendet. Die Biopsien wurden in 200 µl Tail-lysis Puffer bei 55°C über Nacht im Wasserbad verdaut. Dann wurden sie für 15 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert (alle Zentrifugationsschritte bei 4°C in der Tischzentrifuge). Der Überstand wurde dann in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 500 µl Isopropanol hinzugegeben und danach erneut fünf Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 500 µl 70% Ethanol hinzugegeben und das am Boden der Reaktionsgefäße befindliche Pellet resuspendiert. Danach wurden die Proben erneut für fünf Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Reaktionsgefäße für ca.

eine Stunde zum Trocknen aufgestellt. Danach wurden 200 µl TE Puffer hinzugefügt und mehrmals resuspendiert. Die DNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.1.3 PCR

Für jedes Tier wurde jeweils eine PCR mit MDR2-WT Primer und eine PCR mit MDR2-KO Primern durchgeführt. Für jeden PCR Ansatz wurden jeweils 1 µl DNA und 29 µl Master Mix eingesetzt. Der Master Mix setzte sich pro Ansatz zusammen aus:

- 3 µl Dream Taq Green-Buffer 10x
- 0,6 µl dNTP Mix (2 mM)
- 0,9 µl Primer forward
- 0,9 µl Primer reverse
- 0,5 µl Dream Taq DNA-Polymerase
- 23,1 µl ddH₂O

Folgendes Programm wurde im Thermocycler verwendet:

1. 94°C für zwei Minuten
2. 30x Zyklen:
 - a. 94°C für 45 Sekunden
 - b. 60°C für 30 Sekunden
 - c. 72°C für 30 Sekunden
3. 72°C für fünf Minuten

Die fertigen Amplifikate wurden bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.1.4 Gelelektrophorese

Die DNA Amplifikate sowie eine Positiv- und Negativkontrolle wurden auf das Gel aufgetragen und für 20 Minuten bei 550 Volt ihrer Größe nach aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE-Puffer verwendet. Als Referenz diente die FastRuler Low Range DNA Ladder (100-1000 bp). Die Analyse des Gels erfolgte im Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System unter UV Licht. Die Knockoutbande wird bei 442 bp erwartet, die Wildtypbande bei 362 bp Länge.

2.2.2 Tierversuche

2.2.2.1 Verum und Kontrolle

Für das Verum wurde das pulverförmige Thalidomid zunächst in DMSO gelöst und daraufhin 0,3% Hydroxypropylmethylcellulose-Lösung hinzugegeben, sodass in der fertigen Lösung ein Endgehalt von 4% DMSO und 8 mg/ml Thalidomid erreicht wurden.

Für die Kontrolllösung wurden 0,3% Hydroxypropylmethylcellulose-Lösung mit DMSO versetzt bis auch hier ein Endgehalt von 4% DMSO erreicht wurde.

Beide Lösungen wurden lichtgeschützt bei 4°C gelagert und wöchentlich neu angesetzt.

2.2.2.2 Kurzzeitexperiment

Es wurden 23 Männchen und 21 Weibchen im Alter von acht Wochen verwendet. Die Tiere wurden in eine jeweils gleich große Kontroll- und Verumgruppen randomisiert. Die Tiere wurden an Tag 1 gewogen und erhielten für die folgenden fünf Tage durchgehend Verum in einer Dosis von 100 mg Thalidomid pro kg Körpergewicht oder das entsprechende Volumen Kontrolllösung über eine Schlundsonde. An Tag 8 wurden die Tiere gewogen, mit CO₂ getötet, präpariert und Blut und Organe entnommen.

2.2.2.3 Langzeitexperiment

Es wurden 20 Männchen und 21 Weibchen im Alter von fünf Wochen verwendet. Die Tiere wurden in eine Kontroll- und Verumgruppen randomisiert. Die Tiere wurden zu Beginn jeder Woche gewogen und erhielten fünf Tage am Stück einmal täglich Verum in einer Dosis von 100 mg Thalidomid pro kg Körpergewicht oder das entsprechende Volumen Kontrolllösung über eine Schlundsonde. Darauf folgten zwei Tage ohne Gavage. Dieser wöchentliche Zyklus wurde für 24 Wochen beibehalten. Zu Beginn der 25. Woche wurden die Tiere gewogen, mit CO₂ getötet und Blut und Organe entnommen.

2.2.2.4 Blutentnahme

Bauch und Thorax der getöteten Tiere wurden eröffnet. Mit einer 0,5 ml Spritze wurde das Herz punktiert und ca. 1 ml Blut extrahiert. Das Blut wurde bei 4°C und 5.500 rpm für fünf Minuten und dann noch einmal bei 12.000 rpm für zehn Minuten in der

Tischzentrifuge zentrifugiert und dann das Serum in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Serum wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.2.5 Leberentnahme zur RNA Isolation

Die Lebern wurden frei präpariert, die Gallenblasen entfernt und aus dem größten Leberlappen drei je ca. 2x2x2 mm große Leberstückchen entnommen, in ein CryoPure Gefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2.6 Leberentnahme zur histologischen Untersuchung

Aus den präparierten Lebern wurden aus den drei größten Lappen im längsten Durchmesser je ein ca. 2 mm breiter Streifen Lebergewebe entfernt und für 24h bei 4°C in 4% Paraformaldehydlösung fixiert. Die Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe und die Einbettung in Paraffin erfolgten durch das pathologische Institut des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf. Aus den in Paraffin gebetteten Schnitten wurden am Mikrotom 3 µm dicke Schnitte erstellt und auf Superfrost Objektträger überführt.

2.2.3 Messung der Lebertransaminasen

Das Serum wurde auf Eis aufgetaut, 1:2 mit ddH₂O verdünnt und die Alanin-Aminotransferase Werte in einem Cobas Integra 400 plus Analyzer bestimmt.

2.2.4 Genexpressionsanalyse

2.2.4.1 RNA Isolation aus Lebergewebe

Alle Arbeiten fanden unter einem Abzug statt. Es wurden RNase freie Verbrauchsmaterialien und Chemikalien verwendet.

Die Leberstücke wurden auf Trockeneis überführt. Es wurden bei Raumtemperatur 500 µl TriFast hinzugegeben und die Proben mit einem Mikropistil homogenisiert. Anschließend wurden weitere 500 µl TriFast hinzugegeben. Die Proben wurden für ca. 30 Sekunden gründlich durchmischt. Dann wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben, die Proben erneut für ca. 30 Sekunden gründlich durchmischt und anschließend drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4°C und 15.000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation haben sich drei Phasen gebildet: In der oberen Phase befindet sich RNA, in der mittleren DNA und in der unteren Phase Proteine. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß

überführt, 500 µl Isopropanol hinzugegeben und die Proben mehrmals invertiert. Die RNA wurde über Nacht bei -20°C präzipitiert.

Am Folgetag wurde die RNA bei 4°C und 15.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das am Boden befindliche Pellet mit 700 µl 70% Ethanol gewaschen. Danach wurden die Proben erneut bei 4°C und 15.000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für ca. 30 Minuten unter dem Abzug trocknen gelassen. Die RNA wurde dann in 100 µl DEPC UltraPure Wasser gelöst und für fünf Minuten bei 55°C inkubiert. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 RNA Konzentrationsbestimmung

Die RNA Proben wurden auf Eis aufgetaut, der RNA Gehalt jeder Probe mit einem Spectrophotometer NanoDrop 2000 gemessen. Dann wurden alle Proben mit DEPC UltraPure Wasser auf eine einheitliche RNA Konzentration von 200 ng/µl eingestellt. Diese Proben wurden dann zur cDNA Synthese verwendet.

2.2.4.3 cDNA Synthese

Zur cDNA Synthese wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers verwendet. Pro Ansatz wurden 20 µl RNA (200 ng/µl) und 20 µl 2x Reverse Transcription Master Mix verwendet. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4.4 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion

Für die Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion wurde das Kapa Probe Fast qPCR Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Für jeden Ansatz wurden 1 µl cDNA und 9 µl Master Mix in ein Well einer MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaktions Platte pipettiert. Pro Platte gab es eine Negativkontrolle bestehend aus 1 µl Ultra Pure DEPC Treated Water und 9 µl Mastermix. Es wurden Doppelbestimmungen für jede Probe und die Negativkontrolle pipettiert. Die Platten wurden mit MicroAmp Optical Adhesive Film verschlossen und kurz zentrifugiert.

Der Master Mix pro Ansatz setzte sich zusammen aus:

- 5 µl Kapa Probe Fast cPCR Master Mix Universal (2x)
- 0,5 µl Primer
- 0,2 µl ROX high (50x)
- 3,3 µl Ultra Pure DEPC Treated Water

Folgendes Programm wurde im RealTimePCR System StepOnePlus verwendet:

Initiale Denaturierung:		95°C für 20 Sekunden
40 Zyklen à:	Denaturierung	95°C für eine Sekunde
	Annealing/Elongation	60°C für 20 Sekunden

Die Ergebnisse wurden nach der CT Methode ausgewertet.

2.2.5 Immunhistochemie

2.2.5.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Organschnitte wurden in drei Xylolbädern für je fünf Minuten entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils fünf Minuten in 100%, 90%, 70% und 50% Ethanol) rehydriert. Die Schnitte wurden dann für zehn Minuten in Hämalaunlösung nach Mayer inkubiert, zweimal in ddH₂O getunkt und dann für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläuet und danach zum pH-Ausgleich für zwei Minuten in ddH₂O gegeben. Danach wurden die Schnitte für eine Minute in Eosinlösung gegengefärbt und zweimal in ddH₂O getunkt. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert (2x tunken in 50%, 30 Sekunden in 70%, eine Minute in 90% und zweimal zwei Minuten in 100% Ethanol). Danach folgten dreimal fünf Minuten im Xylolbad. Danach wurden die Schnitte mit Eindeckmedium eingedeckelt.

2.2.5.2 Sirius Rot Färbung

Die Sirius Rot Färbung färbt Kollagenfasern rot.

Die Organschnitte wurden in drei Xylolbädern für je fünf Minuten entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils fünf Minuten in 100% und 90%, drei Minuten in 70% und 50% Ethanol) rehydriert. Danach wurden die Schnitte für drei Minuten und danach noch einmal für eine Minute in ddH₂O gegeben. Danach erfolgte die Inkubation

in Sirius Rot Färbelösung für eine Stunde. Danach wurden die Schnitte zunächst einige Male in ddH₂O getunkt und danach noch eine Minute in ddH₂O belassen. Dann folgten zweimal je eine Minute in 100% Ethanol und dreimal je eine Minute im Xylolbad. Danach wurden die Schnitte mit Eindeckmedium eingedeckelt.

2.2.5.3 Sirius Rot Auswertung

Unter dem Mikroskop wurden im Hellfeld bei automatischer Belichtungszeit zwölf High Power Fields (100x Vergrößerung) untersucht. Aus jedem Lappenanschnitt wurden zufällig vier Felder ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass diese sich nicht überschneiden, direkt am Rand lagen oder einen Gefäßanschnitt größer als 20% der gesamten Bildfläche enthielten.

Zur Auswertung der Bilder wurde das Programm ImageJ (Version 1.48) verwendet. Mit der Set-Threshold Funktion wurde unspezifische Färbung der Zellkerne und des Zellplasmas eliminiert und die angefärbte Fläche in Prozent der Gesamtfläche des Bildes gemessen. Bei Anschnitt großlumiger Gefäße in den Bildausschnitten wurden diese flächenkorrigiert.

2.2.5.4 F 4/80 Färbung

F 4/80 ist ein Antigen das auf murinen Makrophagen exprimiert wird. Im hier verwendeten Protokoll werden die Makrophagen bräunlich angefärbt.

Die Organschnitte wurden in drei Xylolbädern für je fünf Minuten entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils fünf Minuten in 100%, 90%, 70% und 50% Ethanol) rehydriert und dann für fünf Minuten in ddH₂O gegeben. Dann wurden die Schnitte für 30 Minuten in 3% Wasserstoffperoxid (in Methanol) inkubiert und danach dreimal drei Minuten in PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Schnitte 30 Minuten mit 1% BSA in PBS in der Feuchtkammer geblockt und anschließend die Flüssigkeit entfernt. Danach wurden die Schnitte für eine Stunde in der Feuchtkammer mit dem ersten Antikörper (Abcam Rat monoclonal CIA3-1 ab 6640, 1:200 verdünnt in 1% BSA in PBS) inkubiert und dann dreimal drei Minuten in PBS gewaschen. Danach wurde für 30 Minuten mit Goat-Serum geblockt. Daraufhin folgten 30 Minuten Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Goat Anti-Rat (H+L), Peroxidase-conjugated) und anschließend dreimal drei Minuten waschen mit PBS.

Zur Visualisierung wurden die Schnitte in DAB-Entwicklungslösung (1:50) inkubiert. Die Reaktion wurde nach zwei Minuten in ddH₂O gestoppt.

Danach wurde für drei Minuten in Hämalaulösung gegengefärbt und fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläuet und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Xylolbädern fixiert. Dann wurden die Schnitte mit Eindeckmedium eingedeckelt.

2.2.5.5 F 4/80 Auswertung

Unter dem Mikroskop wurden im Hellfeld bei automatischer Belichtungszeit zwölf High Power Fields (400x Vergrößerung) abfotografiert. Aus jedem Lappenanschnitt wurden zufällig vier Felder ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass diese sich nicht überschneiden, direkt am Rand lagen oder einen Gefäßanschnitt größer als 20% der gesamten Bildfläche enthielten.

Zur Auswertung der Bilder wurde das Programm ImageJ (Version 1.48) verwendet. In jeden High Power Field wurden die angefärbten Zellen gezählt und das arithmetische Mittel der zwölf High Power Fields eines Tieres ermittelt.

2.2.5.6. Untersuchung auf Dysplasien

Die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitte wurden von einem mit dem Mdr2-Mausmodell vertrauten Pathologen mikroskopisch auf das Vorliegen von Tumoren und dysplastischen Vorstufen des Gallengangsepithels untersucht. Unterschieden wurde zwischen low grade Dysplasie, high grade Dysplasie, Carcinoma in situ und manifesten Karzinomen.

3. Ergebnisse

3.1. Kurzzeitexperiment

In diesem Versuch wurde Mdr2-KO Mäusen im Alter von acht Wochen fünf Tage lang täglich Thalidomid (100 mg/kg Körpergewicht in DMSO-Hydroxypropylmethylcelluloselösung) oral verabreicht. Der Kontrollgruppe wurde auf die gleiche Weise Kontrolllösung (DMSO-Hydroxypropylmethylcelluloselösung) verabreicht. Am achten Tag nach Beginn der Behandlung wurden die Tiere geopfert. Aus dem Blut der Tiere wurden die Lebertransaminasen bestimmt und aus den Lebern wurde RNA zur Messung der Expression diverser Gene, die eine wichtige Rolle bei Entzündung und Fibrose spielen, isoliert. Abbildung 2 zeigt schematisch den zeitlichen Ablauf der Experimente.

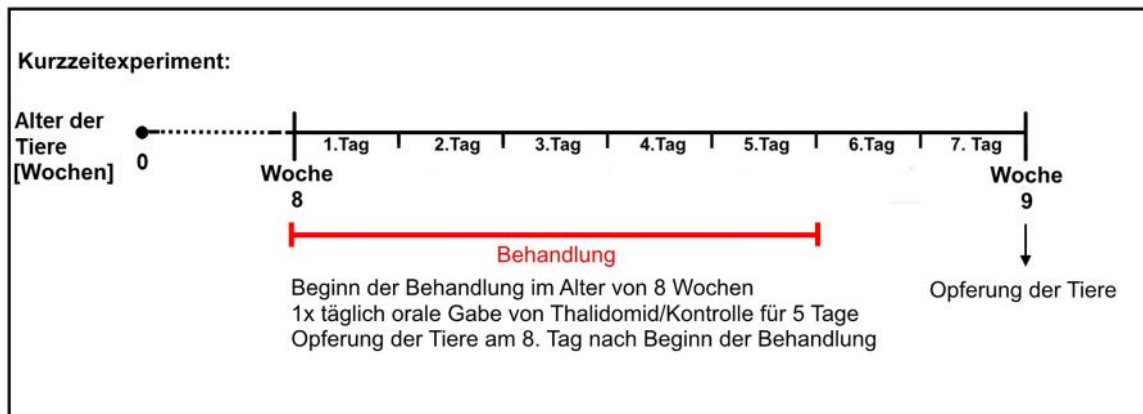


Abb.2) Zeitlicher Ablauf des Kurzzeitexperiments

Hinsichtlich der Gewichtsentwicklung und makroskopischer Auffälligkeiten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (siehe Tabelle 1). Bei keinem der Tiere zeigten sich makroskopisch sichtbare Tumore der Leber.

Gruppe	Gewicht bei Beginn	Gewicht bei Opferung	auffällige Leber	auffällige Milz	Makroskopisch sichtbare Tumore
Männchen Thalidomid (n=11)	25,2	25,1	1	7	0
Männchen Kontrolle (n=12)	24,0	24,2	7	8	0
Weibchen Thalidomid (n=10)	21,3	20,9	3	8	0
Weibchen Kontrolle (n=11)	21,1	20,4	3	8	0

Tabelle 1: Kurzzeitexperiment, durchschnittliches Gewicht (in Gramm) zu Beginn und Ende des Experiments und Anzahl der Tiere mit makroskopischen Auffälligkeiten der Organe. Nach der einwöchigen Gabe von Thalidomid/Kontrolle zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Gewichts. Einige Tiere sowohl der Thalidomid- als auch der Kontrollgruppen zeigten makroskopisch auffällige Lebern und Milzen mit unterschiedlich stark ausgeprägter Marmorierung, wie sie in Abbildung 3 zu sehen sind, makroskopisch sichtbare Tumore zeigten sich jedoch in keinem der Tiere.

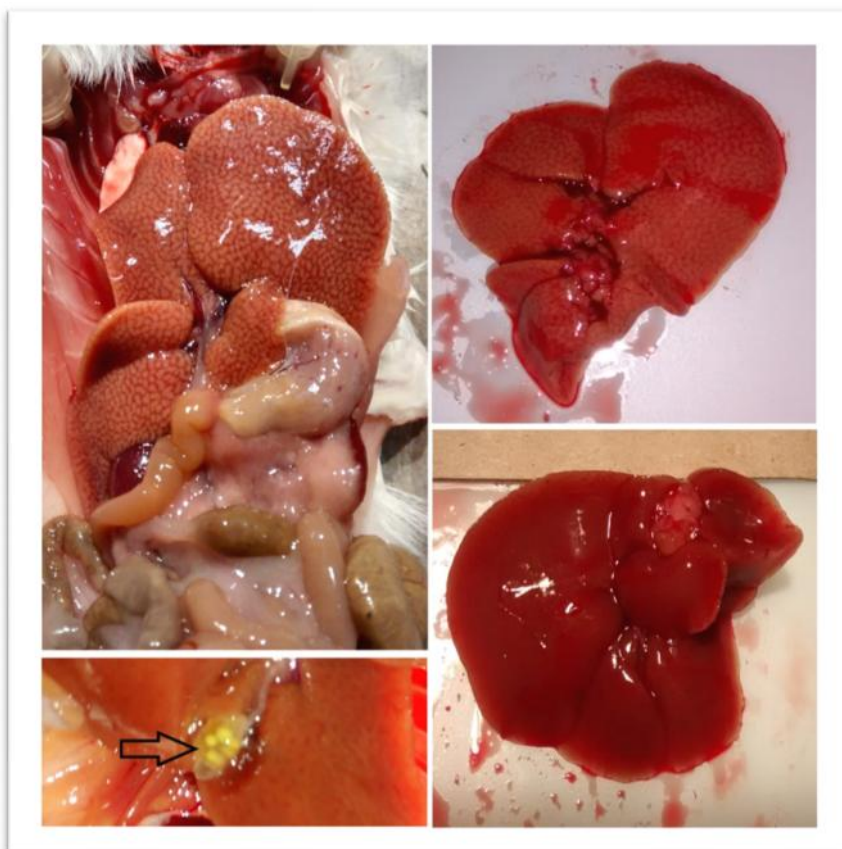


Abb. 3:
Makroskopische Auffälligkeiten der Organe der Versuchstiere

Einige der Tiere sowohl der Thalidomid- als auch der Kontrollgruppe zeigten eine auffällige Textur des Lebergewebes (oben links, oben rechts). Im Vergleich dazu eine unauffällige Leber (unten rechts). Bei einigen Tieren fanden sich zudem sichtbare Konkreme in der Gallenblase (unten links).

3.1.1 Lebertransaminasen

Die einwöchige Gabe von Thalidomid zeigte keinen signifikanten Unterschied der Serumtransaminasen (ALT) der therapierten Tiere gegenüber der Kontrollgruppe. Die Weibchen sowohl der Therapie- als auch der Kontrollgruppe zeigten höhere Transaminasenwerte als die Männchen.

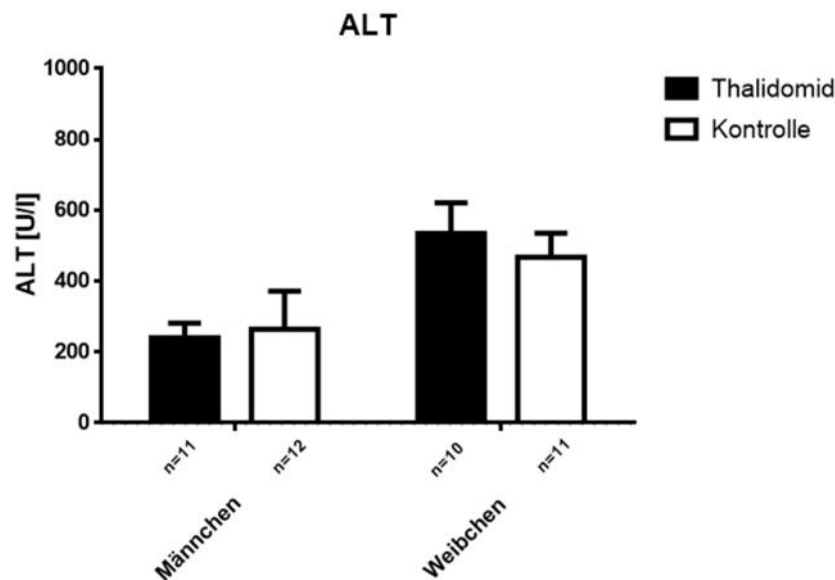


Abb. 4) Serumtransaminasen (ALT in U/l) in männlichen und weiblichen Mdr2-KO Mäusen nach einwöchiger Gabe von Thalidomid/Kontrolle

3.1.2 Auswirkung von Thalidomid auf die Genexpression

Aus Lebergewebe der einwöchig behandelten Tiere wurde RNA isoliert und aus dieser anschließend cDNA synthetisiert. Per quantitativer Real-Time Polymerase Kettenreaktion wurde die Expression der Gene folgender Zytokine bestimmt:

CXCL-2: CXCL-2 (Chemokine C-X-C motif ligand 2) ist ein von Monozyten und Makrophagen sezerniertes Chemokin, das eine chemotaktische Wirkung auf polymorphkernige Leukozyten und hämatopoetische Stammzellen besitzt (Wolpe et al. 1989; Murphy et al. 2008).

IL-1: IL-1 (Interleukin 1 beta) wird von aktivierten Makrophagen produziert und ist ein wichtiger Mediator der Immunantwort. IL-1 stimuliert unter anderem die Synthese von akute Phase Proteinen und wirkt als endogenes Pyrogen. (Murphy et al. 2008)

IL-6: IL-6 (Interleukin 6) wird von T-Zellen und Makrophagen produziert und spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort. Es besitzt sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte. IL-6 stimuliert die Antikörperproduktion in B-Zellen und die Synthese von akute Phase Proteinen. (Ding et al. 2009; Heinrich et al. 2003; Murphy et al. 2008)

LEPRE-1: LEPRE-1 (Leucine- and proline-enriched proteoglycan 1; oder P3H1 prolyl 3-hydroxylase 1 genannt) spielt eine wichtige Rolle bei der korrekten Synthese und Anordnung von Kollagen.

NOS-2: NOS-2 (Nitric oxid synthase 2, oder iNOS inducible Nitric oxide synthase) ist die induzierbare Variante der Stickstoffmonoxid Synthase. Stickstoffmonoxid besitzt eine breite antimikrobielle Aktivität (Murphy et al. 2008).

TNF: TNF (Tumornekrosefaktor) ist ein von Makrophagen, Natürlichen Killerzellen und T-Zellen produziertes Chemokin das eine große Rolle in der Entzündungsreaktion des Körpers spielt. Seine Bildung und Ausschüttung wird unter anderem durch den NFkB-Signalweg gesteuert. Es aktiviert Endothelzellen, die Synthese akuter Phase Proteine und wirkt pyrogen. (Murphy et al. 2008)

TNFRsf-1: TNFRsf-1 (Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Subfamilie 1) ist einer der TNF-Rezeptoren mit intrazelluläre Todesdomäne, seine Aktivierung kann sowohl zur Apoptose als auch über die Aktivierung von NF B und anderer Transkriptionsfaktoren zur Immunmodulation beitragen (Murphy et al. 2008)

Als Housekeeping Gen wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), ein konstitutiv exprimiertes Enzym der Glykolyse, verwendet.

Bei den Weibchen zeigte sich eine fast zweifach erhöhte fold change ($p=0,035$) der Genexpression von LEPRE-1 bei der Kontrollgruppe gegenüber den mit Thalidomid behandelten Tieren. Die einwöchige Gabe von Thalidomid zeigte ansonsten bei keinem der untersuchten Zytokine eine statistisch signifikante Änderung der Genexpression.

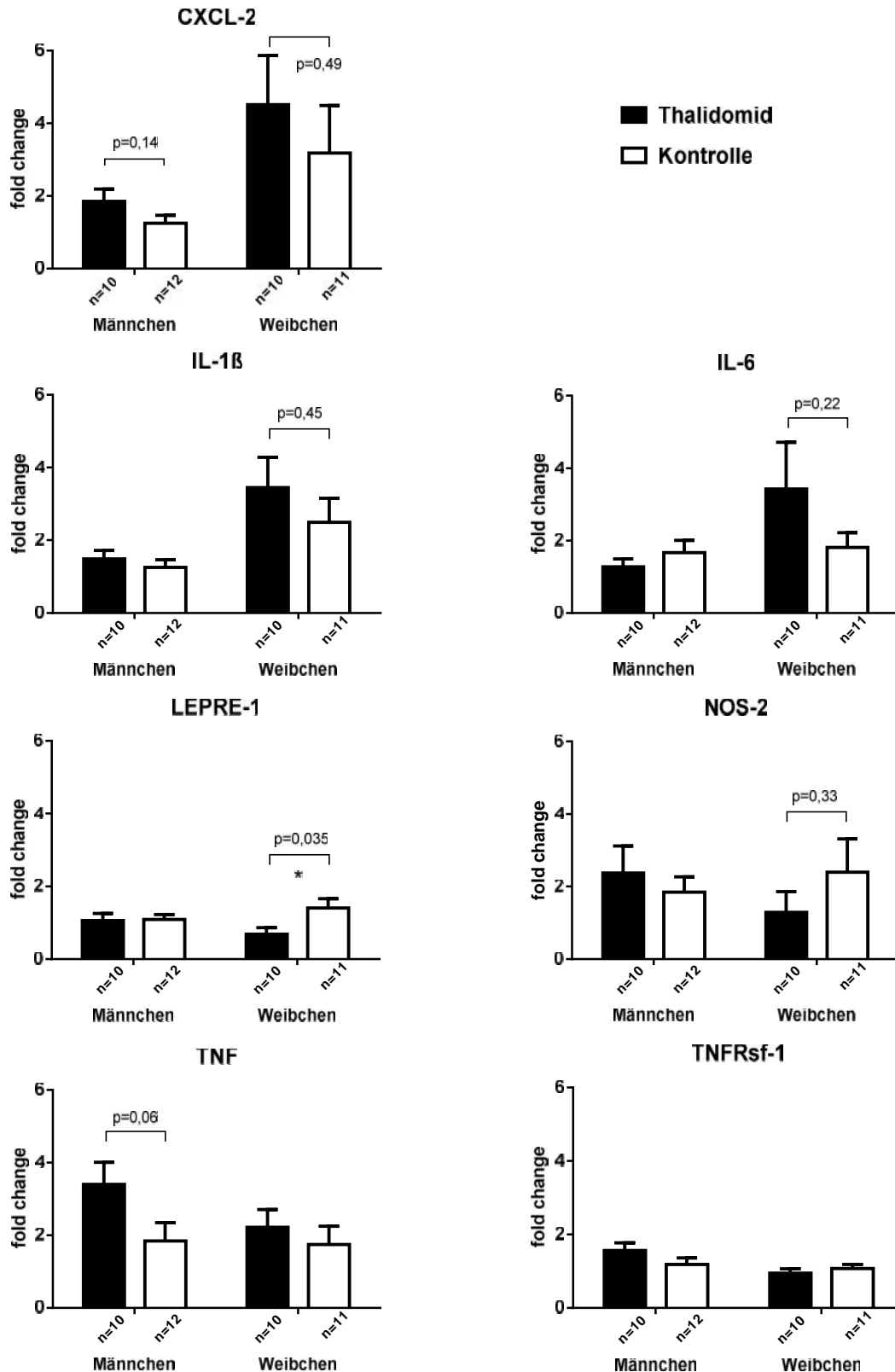


Abb. 5) Unterschiede der Genexpression (fold change: x-fache Expression gegenüber Kontrolle nach CT-Methode) in männlichen und weiblichen Mdr2-KO Mäusen nach einwöchiger Gabe von Thalidomid/Kontrolle

3.2 Langzeitexperiment

In diesem Experiment wurde Mdr2-KO Mäusen ab der fünften Lebenswoche für eine Dauer von 24 Wochen fünfmal wöchentlich Thalidomid (100 mg/kg Körpergewicht in DMSO-Hydroxypropylmethylcelluloselösung) oral verabreicht. Der Kontrollgruppe wurde auf die gleiche Weise Kontrolllösung (DMSO-Hydroxypropylmethylcelluloselösung) verabreicht. Im Alter von 29 Wochen wurden die Tiere geopfert. Aus dem Blut der Tiere wurden die Lebertransaminasen bestimmt und die Lebern wurden zur histologischen Untersuchung präpariert. Abbildung 6 zeigt schematisch den zeitlichen Ablauf des Experimentes.

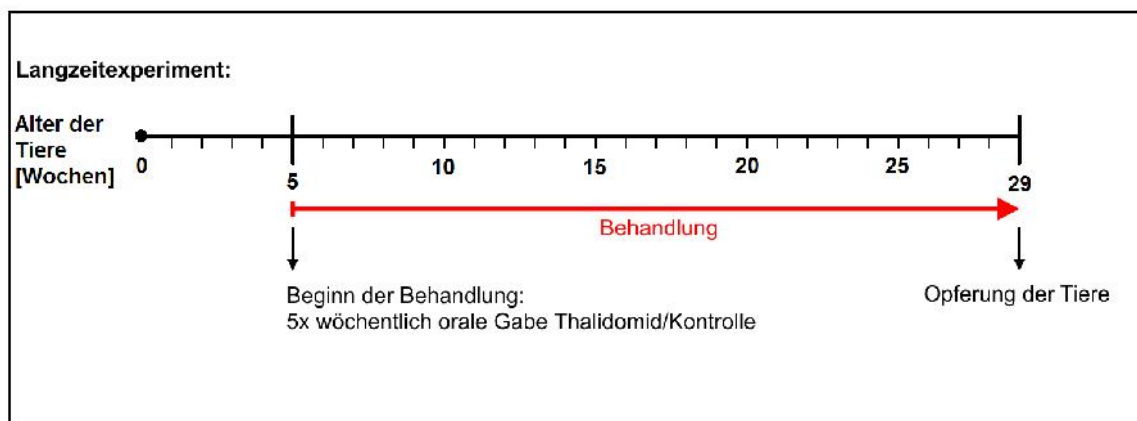


Abb. 6) Zeitlicher Ablauf des Langzeitexperimentes

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtsentwicklung, der Zahl der Zensierungen und der Häufigkeit makroskopischer Auffälligkeiten der Organe zwischen der Thalidomid- und der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 2). Bei keinem der Tiere zeigten sich bei der Opferung im Alter von 29 Wochen makroskopisch sichtbare oder tastbare Tumore der Leber.

Gruppe	Gewicht bei Beginn	Gewicht bei Opferung	Zensierungen	Anzahl Gavages	Gesamtdosis Thalidomid	auffällige Leber	Gallenkonkremente	auffällige Milz	Makroskopisch sichtbare Tumore
Männchen Thalidomid (n=10)	20,5	30,0	2	120	648,5mg	1	2	3	0
Männchen Kontrolle (n=10)	20,6	31,7	1	120	0mg	2	2	3	0
Weibchen Thalidomid (n=11)	18,5	29,6	1	120	567,5mg	1	8	1	0
Weibchen Kontrolle (n=10)	18,2	29,3	1	120	0mg	0	7	2	0

Tabelle 2: Langzeitexperiment, durchschnittliches Gewicht (in Gramm) zu Beginn und Ende des Experiments, Anzahl der Zensierungen durch vorzeitigen Tod und Anzahl der Tiere mit makroskopischen Auffälligkeiten der Organe. Außerdem die Gesamtanzahl an Gavages pro Tier und die durchschnittliche Gesamtdosis Thalidomid pro Tier über den kompletten Zeitraum des Experiments.

Nach der Gabe von Thalidomid/Kontrolle über einen Zeitraum von 2 Wochen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Gewichtsentwicklung und der Anzahl der Zensierungen. Einige Tiere sowohl der Thalidomid- als auch der Kontrollgruppen zeigten makroskopisch auffällige Lebern und Milzen mit unterschiedlich stark ausgeprägter Marmorierung und Konkrementen in der Gallenblase. Keines der Tiere zeigte makroskopisch sichtbare Tumoren.

3.2.1 Lebertransaminasen

Die Gabe von Thalidomid über 24 Wochen zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied der Serumtransaminasen (ALT) der therapierten Tiere gegenüber der Kontrollgruppe. Die Weibchen sowohl der Therapie- als auch der Kontrollgruppe zeigten höhere Transaminasenwerte als die Männchen.

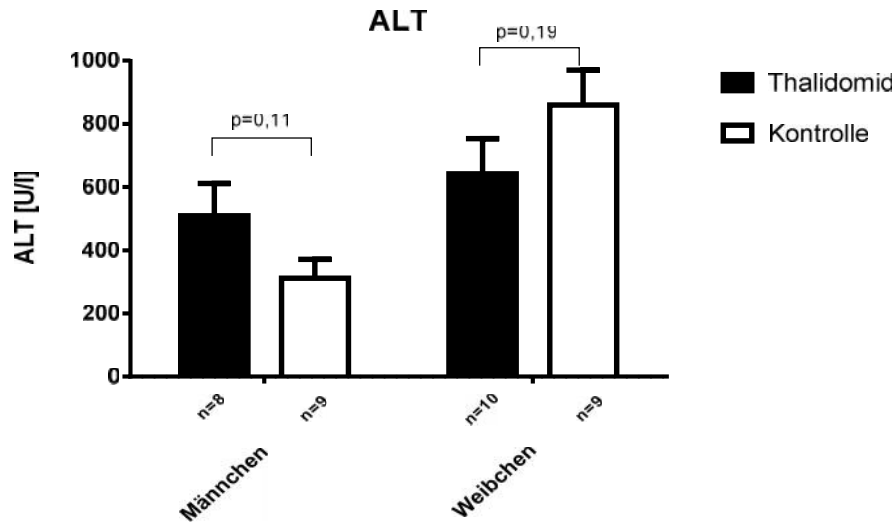


Abb. 7) Serumtransaminasen (ALT in U/l) in männlichen und weiblichen Mdr2-KO Mäuse nach 24-wöchiger Gabe von Thalidomid/Kontrolle

3.2.2 Sirius Rot

Zur Bestimmung des Grades der Fibrose wurden Leberschnitte Sirius Rot gefärbt. Bei dieser Färbung stellen sich kollagene Fasern rot dar. Angegeben wird der Anteil der Fibrose an der Gesamtfläche (siehe Material und Methoden, 2.2.5.3).

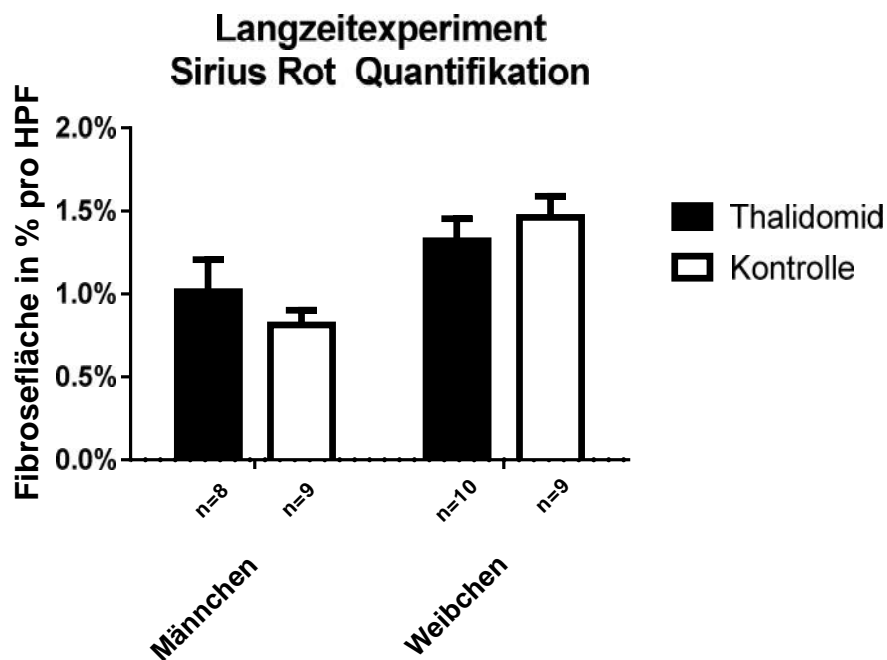


Abb. 8) Fibrosefläche (Prozent der Gesamtfläche pro High-Power-Field) in männlichen und weiblichen Mdr2-KO Mäusen nach 24-wöchiger Gabe von Thalidomid/Kontrolle

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Größe der fibrotischen Areale zwischen therapierten Tieren und der Kontrollgruppe. Weibliche Tiere wiesen jedoch im Schnitt, wie schon bei der Messung der Lebertransaminasen, höhere Werte auf.

3.2.2 F 4/80 Färbung

Die entzündliche Aktivität im Lebergewebe wurde mit Hilfe der F 4/80 Färbung untersucht. F 4/80 ist ein Oberflächenmarker der spezifisch von Makrophagen exprimiert wird. Mikroskopisch stellen sich Makrophagen in der Färbung braun vor blauem Hintergrund dar und können so ausgezählt werden. Pro Tier wurden zwölf High-Power-Fields aus drei unterschiedlichen Leberlappen untersucht.

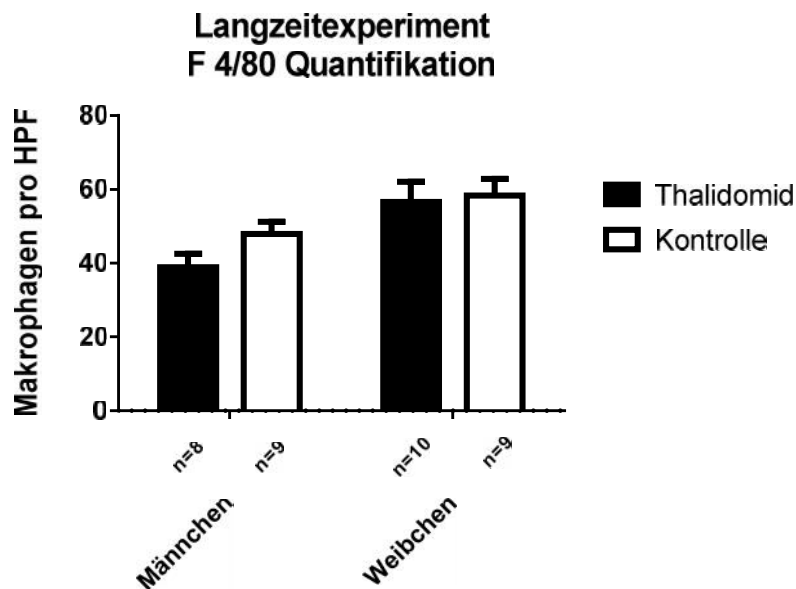


Abb. 9) Anzahl Makropagen pro High-Power-Field in männlichen und weiblichen Mdr2-KO Mäusen nach 24-wöchiger Gabe von Thalidomid/Kontrolle

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Anzahl von Makrophagen im Lebergewebe zwischen Tieren, die Thalidomid erhielten und Tieren die Kontrolllösung erhielten. Weibchen zeigten gegenüber Männchen eine leicht erhöhte Anzahl an Makrophagen.

3.2.3 Dysplasien

Die HE-gefärbten Schnitte wurden einem Pathologen zur mikroskopischen Untersuchung auf Tumore und dysplastische Vorstufen übergeben. Pro Tier wurden Ausschnitte aus drei unterschiedlichen Leberlappen in HE-Färbung untersucht. Unterschieden wurde zwischen mikroskopisch keinem Anhalt für dysplastische Entartung, low grade-, high grade-Dysplasie und Carcinomen.

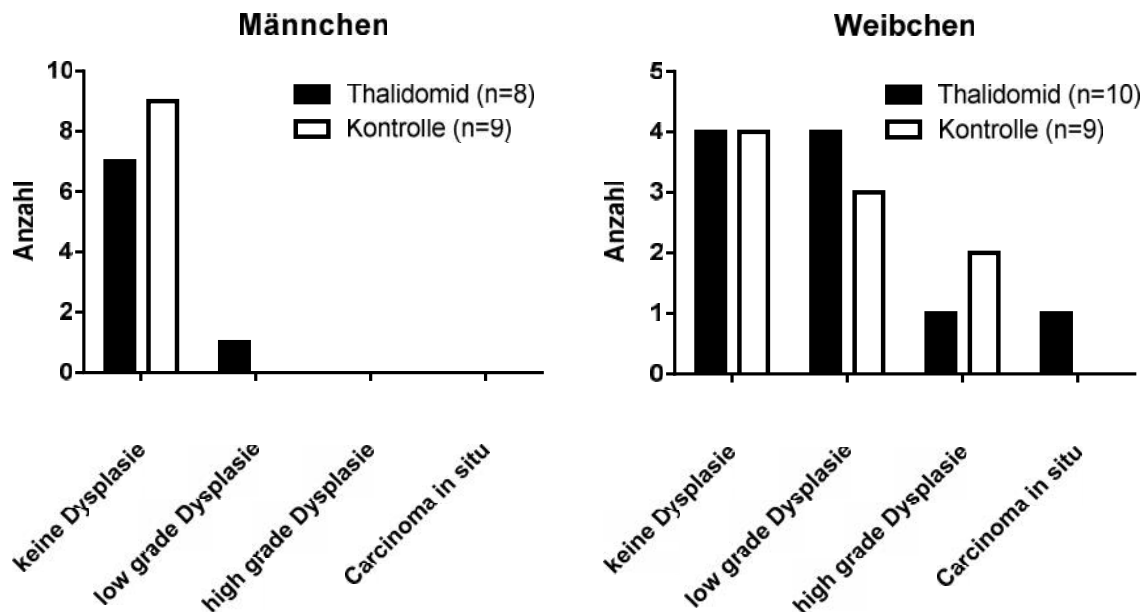


Abb. 10) Anzahl der Tiere ohne dysplastische Entartung, low grade-Dysplasie, high grade-Dysplasie und Carcinoma in situ in männlichen und weiblichen Mdr2-KO Mäusen nach 24-wöchiger Gabe von Thalidomid/Kontrolle

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied des Anteils der Tiere die Dysplasien des Gallengangsepithels aufwiesen, zwischen Tieren, die Thalidomid erhielten und Tieren die Kontrolllösung erhielten. Weibchen zeigten Männchen gegenüber häufiger dysplastische Entartung. Alles untersuchte Lebergewebe zeigte deutliche Zeichen eines entzündlichen Geschehens mit massiven lymphozytären Infiltraten in den periportalen Feldern und zwiebelschalenartiger Fibrose um die Gallengänge. In keinem der untersuchten Schnitte ließen sich manifeste Tumoren feststellen, eines der Tiere zeigte jedoch ein Carcinoma in situ des Gallengangs.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt von Thalidomid in einem Mausmodell der Primär Sklerosierenden Cholangitis zu erforschen. Dazu untersuchten wir Parameter der Entzündungsaktivität, Leberschädigung, Fibrose und Dysplasie bei kurz- (eine Woche) und langfristiger (sechs Monate) oraler Gabe von Thalidomid bei Mdr2-KO Mäusen.

Die Primär Sklerosierende Cholangitis ist eine progressive, chronische, entzündliche Erkrankung der intra- und/oder extrahepatischen Gallengänge, die im Verlauf zu Fibrose und Entstehung von Lebertumoren führt. Die Ätiologie der Erkrankung ist unklar und es gibt bis dato keine kurative Therapie.

Mdr2-KO Mäuse entwickeln aufgrund eines fehlerhaften Galletransporters eine der Primär Sklerosierenden Cholangitis histologisch sehr ähnliche Leberschädigung mit konsekutiver Fibrose und dysplastischer Entartung. Dadurch hat sich das Mdr2-KO Mausmodell in der Erforschung chronischer und entzündlicher Gallenwegserkrankungen etabliert (Popov et al. 2005b).

Thalidomid erfuhr in den letzten Jahren aufgrund seiner immunmodulatorischen, antiangiogenetischen und antifibrotischen Wirkung viel Aufmerksamkeit. Während die genauen Wirkmechanismen noch unklar sind zeigte sich bei diversen Fibrosemodellen in Ratte und Maus eine deutliche Wirksamkeit (Enomoto et al. 2002; Tabata et al. 2007; Mondello et al. 2009; Lv et al. 2007; Dong et al. 2017b).

Eine Forschergruppe wollte bereits den Einsatz von Thalidomid direkt bei Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis untersuchen, jedoch wurde die Studie wegen fehlender Partizipation eingestellt (ClinicalTrials.gov Referenznr: NCT00953615).

Darum entschlossen wir uns, die Wirksamkeit von Thalidomid anhand des zur Erforschung der Primär Sklerosierenden Cholangitis etablierten Mdr2-KO Modells zu untersuchen.

Dabei konzentrierten wir uns auf zwei Fragestellungen:

1. Zeigen sich bereits nach der einwöchigen Gabe von Thalidomid messbare Unterschiede in der Genexpression einer Auswahl wichtiger, an Entzündungsreaktionen und Fibroseprozessen beteiligter Zytokine?

2. Zeigen sich nach 6-monatiger Gabe von Thalidomid histologisch Unterschiede des Ausmaßes der Leberfibrose, der Infiltration durch Entzündungszellen und der Anzahl von Tumoren und Frühformen der Dysplasie?

Nach einwöchiger Gabe von Thalidomid zeigte sich lediglich bei einem (LEPRE-1) hier untersuchten Zytokin, das mit Fibrogenese in Verbindung gebracht wird, ein statistisch signifikanter Unterschied der Genexpression, und dies auch nur in Weibchen (siehe Abb. 5). Bei allen anderen im Kurzzeitexperiment untersuchten Parametern ließ sich kein statistisch signifikanter Effekt zeigen.

Um zu untersuchen, ob länger als eine Woche mit Thalidomid therapiert werden muss um einen adäquaten Effekt zu erreichen führten wir das Langzeitexperiment durch. Den Tieren wurde beginnend im Alter von fünf Wochen - zu diesem Zeitpunkt gibt es noch keine histologisch sichtbaren Veränderungen - für 24 Wochen fünfmal wöchentlich per oral Thalidomid bzw. Kontrolllösung verabreicht. Die Tiere sowohl der Therapie- als auch der Kontrollgruppe zeigten gleichartige Gewichtsverläufe, es ergab sich kein signifikanter Unterschied der Anzahl an Zensuren.

Im Alter von 29 Wochen wurden die Tiere geopfert und untersucht. Im Alter von 29 Wochen zeigen Mdr2-KO Mäuse mit FVB/N Hintergrund typischerweise schon stark ausgeprägte hepatische Entzündung, Fibrose und Dysplasien.

Die Serumtransaminasen wurden bestimmt und das Lebergewebe histologisch auf Entzündung, Fibrose und das Auftreten von Dysplasien untersucht. Die Tiere zeigten eine ausgeprägte Leberfibrose, sowie entzündliche Infiltrate, insbesondere der periportalen Felder und Gallengänge und dysplastische Entartung der Gallengangsepithelien. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen der Referenzstudien waren die Weibchen deutlich stärker betroffen als die Männchen.

Es ließ sich jedoch weder in der Ausprägung von Entzündung und Fibrose noch in der Häufigkeit dysplastischer Entartung ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe zeigen.

Zusammenfassend konnten wir einen kurz- noch langfristig Effekt von Thalidomid nicht nachweisen.

Wir orientierten uns bei Art der Gabe und Dosis an Publikationen, die bereits über einen deutlich kürzeren Zeitraum der Applikation nachweisbare Effekte zeigen

konnten. Das Thalidomid bzw. die Kontrolllösung wurden per Gavage direkt intragastral appliziert. Die Tiere wurden nach der Applikation beobachtet um auszuschließen, dass sie das Mittel wieder erbrachen. Es gab keinen Hinweis für Diarrhöen. Die von uns gewählte Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht bei fünfmal wöchentlicher Gabe zeigte in anderen Versuchen bereits bei kurzfristigerer Gabe in einem anderen Mausmodell der Fibrose Wirksamkeit (Lv et al. 2007). Deswegen halten wir es für unwahrscheinlich, dass die Ergebnisse Folge eines fehlerhaften Versuchsaufbau sind. Vorversuche zur Dosistitration wurden bei der Tierversuchsgenehmigung seitens der Ethik-Kommission abgelehnt.

Da die Tiere bei Opferung bereits deutliche Zeichen einer Entzündung, Fibrose und von dysplastischen Veränderungen zeigten, scheint der Beobachtungszeitraum auch nicht zu kurz gewählt zu sein. Hätte Thalidomid in diesem Versuchsaufbau einen Effekt gezeigt, so hätte dieser im von uns gewählten Beobachtungszeitraum messbar sein sollen.

Da es zwischen Therapie- und Kontrollgruppe weder in der Zahl der Zensierungen noch der Gewichtsentwicklung statistisch signifikante Unterschiede gab, erscheint eine eventuelle Toxizität des Thalidomids unwahrscheinlich. Bei einer Toxizität des Thalidomids wäre davon auszugehen, dass die Tiere kränker wären und in ihrer Entwicklung eingeschränkt verblieben.

Einer der von uns im Vorfeld vermuteten Wirkmechanismen des Thalidomids in diesem Versuch ist die Hemmung von NF-kappa B und folgend der verminderten Produktion proentzündlicher Zytokine wie TNF-alpha und IL-6 (Song et al. 2016). Dementsprechend ist es unerwartet, dass sich in unseren Untersuchungen kein Effekt – insbesondere auch direkt auf die Expression der o.g. Zytokine – zeigen ließ.

Es erscheint am wahrscheinlichsten, dass die von uns durchgeführte Gabe von Thalidomid weder kurzfristig noch langfristig einen relevanten biologischen Effekt auf den Verlauf der Erkrankung im Mdr2-KO Modell hat. Dass es einen Effekt gibt, welchen wir in unserem Versuchsaufbau schlicht nicht messen konnten, ist in Anbetracht der breit aufgestellten Palette an Untersuchungen nicht wahrscheinlich.

Schließlich müssen wir uns auch fragen, inwieweit sich die Ergebnisse unserer Untersuchungen vom Mausmodell auf den Menschen übertragen lassen. Diese Frage ist schwer zu beantworten, da sowohl über die genauen Wirkmechanismen des Thalidomids als auch über die Pathogenese der Primär Sklerosierenden Cholangitis

zu wenig bekannt ist. Somit lässt sich mit unseren Versuchen leider nicht klären, welchen Signalwegen eine wichtige, oder aber auch überhaupt keine Bedeutung zukommt.

Mit umfassenderem Verständnis der Wirkweise des Thalidomids ließen sich sicherlich weitere Einsatzgebiete finden.

Die Entwicklung neuer Therapeutika für die Primär Sklerosierende Cholangitis ist schwierig. Es fehlt uns ein umfassendes Verständnis der Krankheitsentstehung, was es erschwert Therapie-Targets zu identifizieren und vorherzusehen, ob sich im Tierversuch gefundene Ergebnisse auf den Menschen übertragen lassen. Erschwerend kommt hinzu, dass harte klinische Endpunkte wie Mortalität und die Zeit bis zur Transplantation langwierige Nachsorgeuntersuchungen erfordern und es – bedingt durch die Seltenheit der Erkrankung – beinahe unmöglich ist, ausreichend große Studienkohorten zu bilden um seriöse Aussagen zu treffen. Die meisten Studien greifen auf laborchemische (insbesondere AP, AST, ALT) und klinische Surrogatparameter in Form von Scores (bspw. Mayo-Score) zurück. Ob, und in wie weit sich hiermit jedoch die tatsächliche Krankheitsaktivität abbilden und die individuelle Prognose bestimmen lassen, ist umstritten (Ponsioen et al. 2016).

Die aktuell verfolgten Therapieansätze der Primär Sklerosierenden Cholangitis können ihrer Wirkweise nach den verschiedenen Theorien der Krankheitsentstehung zugeordnet werden.

Die „aberrant gut lymphocyte homing“- Theorie geht davon aus, dass eine Rekrutierung bereits im Darm aktivierter T-Lymphozyten durch Cholangiozyten ursächlich für Entstehung der Primär Sklerosierenden Cholangitis ist. Die T-Lymphozyten bewirken über die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine die Entzündung und konsekutiv fibrotische Umbauprozesse des hepatobiliären Systems. Dementsprechend erscheinen immunmodulative Therapeutika - insbesondere Biologicals, die bei vielen Autoimmunerkrankungen zur Standardtherapie aufgestiegen sind - vielversprechend. Leider zeigten immunmodulative Therapieansätze überwiegend enttäuschende Ergebnisse bei Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis.

Klassische Immunsuppressiva wie Methotrexat, Mycophenolat-Mofetil und Tacrolimus zeigten keine signifikante Verbesserung des Patientenoutcomes (Knox & Kaplan 1994; Talwalkar et al. 2005; Van Thiel et al. 1995).

Eine retrospektive Studie bei Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis welche bei simultaner chronisch entzündlicher Darmerkrankung mit Adalimumab, Infliximab (TNF-alpha Antagonisten) und Vedulizumab (Integrin-Antagonist) behandelt wurden zeigte keinen positiven Effekt auf den Verlauf der Primär Sklerosierenden Cholangitis (Tse et al. 2018). Studien zur Wirksamkeit von Etanercept (TNF Antagonist) zeigten die gleichen Ergebnisse (Epstein & Kaplan 2004).

Die „leaky gut“ Hypothese sieht die Ursache der hepatobiliären Entzündung in einer Barriestörung des Darmepithels (häufig selbst in Folge inflammatorischer Prozesse des Darms), was zu einem Übertritt von bakteriellen Strukturen oder sogar der bakteriellen Besiedlung des Pfortadersystems führt. Die Cholangiozyten reagieren auf die bakteriellen Antigene mit der Produktion proinflammatorischer Zytokine. Dies führt zur Einwanderung von Lymphozyten und über die chronische Entzündung zu Fibrose. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass viele Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis zusätzlich an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen leiden - und umgekehrt - sowie dem Nachweis bakterieller Strukturen in den Lebern betroffener Patienten.

Anhänger dieser Hypothese versuchen den Krankheitsverlauf durch Veränderungen im Mikrobiom des Darmes zu beeinflussen.

Ein kürzlich erschienener Review fasste die Ergebnisse mehrerer Studien zusammen, die den Einsatz von Vancomycin bei Primär Sklerosierender Cholangitis untersuchten. Mehrere der Studien zeigten eine Verbesserung der laborchemischen Surrogatparameter und klinischer Scores unter Vancomycin-Therapie, eine Studie konnte sogar in Leberbiopsien und ERCP positive Effekte zeigen (Damman et al. 2018). Über Art, Dosierung und Dauer der Gabe besteht jedoch Uneinigkeit, eine offizielle Therapieempfehlung kann derzeit noch nicht gegeben werden. Dies wird weiterführend untersucht.

Für Metronidazol in Kombination mit Ursodeoxy-Cholsäure konnte zwar laborchemisch ein positiver Effekt gezeigt werden, histologisch und in der ERCP blieben diese jedoch aus (Färkkilä et al. 2004). Es wurden einige andere Antibiotika untersucht, jedoch meist ohne statistisch signifikante Effekte (Damman et al. 2018). Die Gabe von handelsüblichen Probiotika (Lactobacillus- und Bifidobacillusstämme) zeigte keinen Effekt (Vleggaar et al. 2008).

Autologe Stuhltransplantationen, die für eine Reihe chronischer Darmerkrankungen – inklusive Colitis Ulcerosa und Morbus Chron – als vielversprechende Therapieoption gelten, sollen durch Balancierung des Mikrobioms die entzündliche Aktivität im Darm dämpfen, mit konsekutiver Wiederherstellung der Integrität der Darmbarriere.

Ob dies einen positiven Effekt auf den Verlauf der Primär Sklerosierenden Cholangitis zeigt, wird derzeit in einer klinischen Studie untersucht (ClinicalTrials.gov NCT02424175).

Das „toxic bile“ Modell geht davon aus, dass bei Primär Sklerosierender Cholangitis eine Störung der Synthese, Sekretion und Reabsorption der Gallensäuren besteht. Dies führt zu einer Dysbalance der Gallenzusammensetzung. Entzündung und Fibrose sind nach dieser Theorie direkte Folgen der toxischen Wirkung der Gallensäuren. Daher liegt der Versuch nah, den Krankheitsverlauf durch Eingriffe in den Gallensäurehaushalt zu verändern.

Ursodeoxy-Cholsäure ist eine sekundäre Gallensäure, die fester Bestandteil des Therapieregimes bei Primär Biliärer Cholangitis ist. Ihr Einsatz bei Primär Sklerosierender Cholangitis bleibt jedoch trotz eingehender Erforschung umstritten. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass es unter Therapie mit Ursodeoxy-Cholsäure zwar zu einer Reduktion der Serumkonzentration der Alkalischen Phosphatase kam, jedoch ohne positiven Effekt auf die Lebenserwartung und unter Inkaufnahme deutlicher Nebenwirkungen. In hoher Dosierung kam es sogar zu einer beschleunigten Progression der Leberfibrose gegenüber Placebo (Olsson et al. 2005).

Deutlich vielversprechender sind die ersten Ergebnisse zu 24-nor-Ursodeoxy-Cholsäure (24-nor-UDCA), einem modifizierten Homolog der Ursodeoxy-Cholsäure. Im Mdr2-KO Mausmodell, welches auch von uns genutzt wurde, zeigte sich nach 4-wöchiger Gabe einer 24-nor- Ursodeoxy-Cholsäure -haltigen Diät im Vergleich zu einer konventionellen Ursodeoxy-Cholsäure-haltigen Diät sowohl histologisch als auch laborchemisch ein deutlicher positiver Effekt auf die Leber (Fickert et al. 2006). Eine randomisierte kontrollierte Studie, die 161 Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis einschloss, konnte zeigen, dass die Gabe von 24-nor-Ursodeoxy-Cholsäure über 12 Wochen gegenüber Placebo dosisabhängig eine signifikante Besserung der laborchemischen Leberparameter zeigte, insbesondere der Alkalischen Phosphatase (Fickert et al. 2017). Ob sich mit 24-nor-Ursodeoxy-Cholsäure jedoch auch tatsächlich die Sterblichkeit und Zeit bis zur

Lebertransplantation verbessern lassen, wird sich zeigen müssen. Wie bereits oben diskutiert, sind laborchemische Parameter wenig aussagefähig bezüglich des tatsächlichen Schweregrades der Erkrankung. Zudem ist fraglich, ob sich die Funde aus dem Mausmodell auf den Menschen übertragen lassen, da das Mdr2-KO Mausmodell dem Archetyp einer „toxic bile“- Pathogenese entspricht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Gallensäuren nicht nur eine passive Rolle in der Gallenzusammensetzung spielen, sondern selbst als Signalmoleküle wirken können (Bouscarel et al. 1995; Bouscarel et al. 1993). Eine Phase-III klinische Studie zum Einsatz von 24-nor-Ursodeoxy-Cholsäure bei Primär Sklerosierender Cholangitis ist derzeit im Gange (ClinicalTrials.gov NCT01755507).

Eine weiteres vielversprechendes Therapieziel ist der Farnesoid-X Rezeptor (FXR). Der Farnesoid-X-Rezeptor wird hauptsächlich in Leber und Dünndarm exprimiert. Seine Aktivierung führt über verschiedene Wege zu einer Drosselung der Gallensäurensynthese, Reduktion der Gallensäurenresorption und zu einer Verdünnung der Galle resultierend in einer weniger „toxischen“ Galle und damit Reduktion der entzündlichen Aktivität (Ananthanarayanan et al. 2001).

Obeticholsäure (OCA) ist ein potenter Farnesoid-X-Rezeptor Ligand, welcher bereits für die Behandlung der Primär Biliären Cholangitis zugelassen ist (Hirschfield et al. 2015). Eine klinische Studie zum Einsatz bei Primär Sklerosierender Cholangitis ist derzeit im Gange (ClinicalTrials.gov NCT02177136).

Versuche zum Einsatz von Tretinoin (ATRA) - ein Retinoid-X-Rezeptor Ligand und Heterodimer des Farnesoid-X-Rezeptors – zeigten keine statistisch signifikanten Effekte (Assis et al. 2017).

Der Einsatz von Fibraten, welche vermittelt über die Aktivierung von PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) die Entzündungsaktivität hemmen und in den Gallensäurehaushalt eingreifen, zeigte bei Primär Biliärer Cholangitis positive Auswirkung auf die Leberbiochemie. Diese Effekte ließen sich auch bei Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis zeigen (Lemoine et al. 2018; Santiago et al. 2018). Ob die Wirkung von Fibraten jedoch auch über die Verbesserung der laborchemischen Parameter hinausgeht, müssen weitere Studien zeigen.

Unabhängig davon, welches der oben genannten Modelle ursächlich für die Entstehung der chronischen hepatobiliären Entzündung sind, gab es Ansätze, die in Folge der Entzündung entstehende Fibrose aufzuhalten.

Ein vielversprechendes Therapeutikum war Simtuzumab, ein LOXL-2 (Lysyl Oxidase Homolog 2) Hemmer. LOXL-2 spielt eine wichtige Rolle in der Synthese und Vernetzung der Extrazellulärmatrix bei fibrosierenden Prozessen. Kontrollierte, randomisierte Studien zur Wirksamkeit von Simtuzumab bei Primär Sklerosierender Cholangitis zeigten jedoch auch nach mehrjähriger Therapie keine positive Wirkung (Muir et al. 2018).

Cenicriviroc ist ein Chemokin-Rezeptor-2 und -5 Antagonist (CCR-2, CCR-5). Beide Rezeptoren werden von Kupffer-Sternzellen und Ito-Zellen in der Leber exprimiert und führen bei Aktivierung zur Ausschüttung proinflammatorischer und profibrotischer Zytokine. Der Einsatz von Cenicriviroc wird derzeit untersucht (ClinicalTrial.gov NCT02653625).

Bis dato konnte keine medikamentöse Therapie der Primär Sklerosierenden Cholangitis mit sicherem Nutzen etabliert werden. Vielversprechende Therapeutika sind sicherlich 24-nor-Urosdeoxy-Cholsäure und Eingriffe in das Mikrobiom der betroffenen Patienten. Ohne sicheres Verständnis der Pathogenese und fehlende Surrogatparameter bleibt die Erforschung neuer Therapieoptionen jedoch schwierig. Für die Behandlung von Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis bleibt ein individuell auf den Patienten zugeschnittenes Behandlungskonzept sicherlich am Wichtigsten. Es gilt mit medikamentösen und interventionellen Therapien Komplikationen schnell zu erkennen und wenn möglich zu beheben. Zudem bleibt es wichtig, Hochrisiko-Patienten rechtzeitig zu erkennen und frühzeitig Neoplasien zu identifizieren und zu bekämpfen.

Das Verständnis über die Krankheit hat in den letzten Jahren rasant zugenommen, und man kann hoffnungsvoll in die Zukunft blicken.

5. Zusammenfassung

Die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC) ist eine chronische cholestatische Erkrankung der Leber. Sie ist charakterisiert durch eine progressive Entzündung und Fibrose der intra- und/oder extrahepatischen Gallengänge. Histologisch zeigt sich dies in Form einer konzentrischen periduktalen Fibrose. Dies führt beim Großteil der Patienten zu Zirrhose und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Leber-, Gallengang- und Pankreaskarzinomen. Bei 60-80% der Patienten liegt zusätzlich eine chronisch entzündliche Darmerkrankung vor. Klinisch äußert sich die Krankheit meist durch Müdigkeit und Pruritus, später können Ikterus, Gewichtsverlust und abdominelle Schmerzen hinzukommen. Häufig liegen bei Erstdiagnose jedoch noch keine Symptome vor. Goldstandard zur Sicherung der Diagnose ist die Durchführung einer endoskopisch retrograden Cholangiopankreatikographie (ERCP) mit typischen „Perlschnur“-artigen Veränderung der Gallengänge. Die Pathogenese der Erkrankung ist unklar. Bis heute gibt es keine kurative Therapie der Erkrankung, auch nach Lebertransplantation entwickeln etwa 30% der Patienten erneut eine Primär Sklerosierende Cholangitis.

Thalidomid, welches im Rahmen des Contergan-Skandals zu trauriger Berühmtheit gelangte, zeigte in diversen Tiermodellen antiinflammatorische, antifibrotische und antiangiogenetische Wirkung.

Ziel unserer Arbeit war es, die Wirkung von Thalidomid auf Entzündung, Fibrose und dysplastische Entartung im Mdr2-KO Mausmodell zu untersuchen. Mdr2-KO Mäuse entwickeln, bedingt durch eine veränderte Gallenzusammensetzung eine chronische Entzündung, Fibrose und dysplastisch Entartung der Gallengänge, die histologisch stark dem Bild der Primär Sklerosierenden Cholangitis ähnelt.

Wir untersuchten zum einem, ob sich bereits nach einwöchiger oraler Gabe von Thalidomid (100 mg/kg Körpergewicht) messbare Unterschiede in der Genexpression einer Auswahl wichtiger, an Entzündungsreaktionen und Fibroseprozessen beteiligter Zytokine zeigten. Zudem untersuchten wir, ob sich nach 6-monatiger oraler Gabe von Thalidomid (100 mg/kg Körpergewicht) histologisch Unterschiede des Ausmaßes der Leberfibrose, der Infiltration durch Entzündungszellen und der Anzahl von Tumoren und Frühformen der Dysplasie zeigten.

Wir konnten für keinen der untersuchten Parameter eine statistisch signifikante Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe zeigen.

Summary

Primary sclerosing cholangitis (PSC) is a chronic cholestatic liver disease. It is characterized by progressive inflammation and fibrosis of intra- and extrahepatic bile ducts, visible as concentric fibrosis of the bile ducts („onion skins“) under the microscope. A majority of affected patients suffer from hepatic cirrhosis and show a higher rate of hepatic, pancreatic and cholangiocellular tumors. Patients often suffer from additional chronic inflammatory bowel disease. First symptoms include fatigue and itchiness of the skin, followed by icterus, weight loss and abdominal pain. Most patients show no symptoms when the diagnosis is made. The diagnosis can be confirmed by cholangiopancreaticographic imaging showing the typical „pearl-like“ appearance of the bile ducts. The pathogenesis remains indeterminate. To this day there is no cure for the disease, even after successful liver transplantation 30% of patients develop primary sclerosing cholangitis again.

Thalidomide, known for its teratogenic effect in pregnant women showed antiinflammatory, antifibrotic and antiangiogenetic effects in several studies.

We wanted to determine, if inflammation, fibrosis and dysplasia can be prevented in Mdr2-KO mice by oral treatment with Thalidomide. Mdr2-KO mice lack a specific bile transport protein, leading to toxic bile damages of bile ducts with consecutive inflammation, fibrosis and dysplasia that are histologically similar to the changes in primary sclerosing cholangitis.

We examined, if treatment with Thalidomide for one week leads to changes in expression of certain cytokines known to play a role in inflammation and fibrosis. Furthermore we examined if treatment with Thalidomide for six months leads to histological changes in the severity of fibrosis, inflammation and dysplasia.

We were not able to show a significant difference compared to controls for any of the examined parameters.

6. Abkürzungsverzeichnis

Kürzel	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AIH	Autoimmune Hepatitis
ALT/ALAT	Alanin-Aminotransferase
BSA	Bovine Standard Albumin
ca	circa
bp	Basenpaare
mRNA	messenger RNA
cDNA	complementary DNA
bzw	beziehungsweise
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CD	Cluster of differentiation
Cxcl	Chemokine (C-X-C motif) ligand
d	Tage
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERCP	Endoskopisch-retrograde Cholangiopankreatikografie
g	Gramm
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunden
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Hydrogenchlorid
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
KO	Knockout
l	Liter
Lepre	Leucine Proline-Enriched Proteoglycan
MDR 2	multi-drug resistance 2
mg	Miligramm
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minuten
ml	Milliliter
MRCP	Magnetresonanz Cholangiopankreatikografie
NaCl	Natriumchlorid

NF-kappaB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
Nos	Stickstoffmonoxid-Synthase
PBC	Primär biliäre Cholangitis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
qt RT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (20°C)
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunden
TE	TRIS-EDTA
Tnf	Tumornekrosefaktor
TBE	TRIS-Borat-EDTA
Tnfr Sf	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp
UDCA	Ursodeoxy Cholsäure
ABC	ATP binding cassette
ATP	Adenosintriphosphat

7. Literaturverzeichnis

- Ananthanarayanan, M. et al., 2001. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *The Journal of biological chemistry*, 276(31), pp.28857–65. Available at: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M011610200> [Accessed October 7, 2018].
- Anon, Grünenthal Opfer. Available at: <http://www.gruenenthal-opfer.de/Kurzdarstellung>.
- Arai, H. et al., 2011. Thalidomide prevents the progression of peritoneal fibrosis in mice. *Acta histochemica et cytochemica*, 44(2), pp.51–60. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3096082&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 15, 2013].
- Aron, J.H. & Bowlus, C.L., 2009. The immunobiology of primary sclerosing cholangitis. *Seminars in immunopathology*, 31(3), pp.383–97. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2758173&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 1, 2016].
- Assis, D.N. et al., 2017. Combination Therapy of All-Trans Retinoic Acid With Ursodeoxycholic Acid in Patients With Primary Sclerosing Cholangitis: A Human Pilot Study. *Journal of clinical gastroenterology*, 51(2), pp.e11–e16. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0004836-201702000-00002> [Accessed October 7, 2018].
- Azizi, Z. et al., 2016. A Triple Blinded, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of Oral Vancomycin in Primary Sclerosing Cholangitis: a Pilot Study. *J Gastrointestin Liver Dis*, 25(4), pp.457–464.
- Bambha, K. et al., 2003. Incidence, clinical spectrum, and outcomes of primary sclerosing cholangitis in a united states community. *Gastroenterology*, 125(5), pp.1364–1369. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508503013568> [Accessed March 1, 2016].
- Barry-Hamilton, V. et al., 2010. Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the

- development of a pathologic microenvironment. *Nature medicine*, 16(9), pp.1009–17. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.2208> [Accessed January 27, 2017].
- Bergquist, A. et al., 2005. Increased prevalence of primary sclerosing cholangitis among first-degree relatives. *Journal of hepatology*, 42(2), pp.252–6. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827804004751> [Accessed February 3, 2016].
- Boberg, K.M. et al., 1996. Features of autoimmune hepatitis in primary sclerosing cholangitis: An evaluation of 114 primary sclerosing cholangitis patients according to a scoring system for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 23(6), pp.1369–1376.
- Boonstra, K. et al., 2013. Population-based epidemiology, malignancy risk, and outcome of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 58(6), pp.2045–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23775876> [Accessed March 1, 2016].
- Bouscarel, B. et al., 1995. Ursodeoxycholic acid inhibits glucagon-induced cAMP formation in hamster hepatocytes: a role for PKC. *The American journal of physiology*, 268(2 Pt 1), pp.G300-10. Available at: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.1995.268.2.G300> [Accessed October 7, 2018].
- Bouscarel, B., Fromm, H. & Nussbaum, R., 1993. Ursodeoxycholate mobilizes intracellular Ca²⁺ and activates phosphorylase a in isolated hepatocytes. *The American journal of physiology*, 264(2 Pt 1), pp.G243-51. Available at: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.1993.264.2.G243> [Accessed October 7, 2018].
- Bramuzzo, M. et al., 2016. Thalidomide for inflammatory bowel disease: Systematic review. *Medicine*, 95(30), p.e4239. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27472695> [Accessed January 17, 2018].
- Broomé, U. et al., 1996. Natural history and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut*, 38(4), pp.610–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1383124&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 3, 2016].

- Carlesimo, M. et al., 1995. Treatment of cutaneous and pulmonary sarcoidosis with thalidomide. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 32(5 Pt 2), pp.866–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7722046> [Accessed January 16, 2018].
- Chapman, R.W. et al., 1980. Primary sclerosing cholangitis: a review of its clinical features, cholangiography, and hepatic histology. *Gut*, 21(10), pp.870–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1419383&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 3, 2016].
- Cullen, S.N. et al., 2008. High dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis is safe and effective q. , 48, pp.792–800.
- Damman, J.L. et al., 2018. Review article: the evidence that vancomycin is a therapeutic option for primary sclerosing cholangitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 47(7), pp.886–895. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/apt.14540> [Accessed October 6, 2018].
- Ding, C. et al., 2009. Targeting IL-6 in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543780903203789#.VlydO3YvfiU> [Accessed November 30, 2015].
- Dong, X. et al., 2017a. Antiinflammation and Antioxidant Effects of Thalidomide on Pulmonary Fibrosis in Mice and Human Lung Fibroblasts. *Inflammation*, 40(6), pp.1836–1846. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10753-017-0625-2> [Accessed January 17, 2018].
- Dong, X. et al., 2017b. Inhibitory effects of thalidomide on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats via regulation of thioredoxin reductase and inflammations. *Am J Transl Res*, 9(10), pp.4390–4401. Available at: www.ajtr.org [Accessed January 17, 2018].
- Eksteen, B. et al., 2004. Hepatic Endothelial CCL25 Mediates the Recruitment of CCR9 Gut-homing Lymphocytes to the Liver in Primary Sclerosing Cholangitis The Journal of Experimental Medicine. , 200(11).
- Elaraj, D.M. et al., A pilot study of antiangiogenic therapy with bevacizumab and

- thalidomide in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 27(4), pp.259–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15235386> [Accessed January 16, 2018].
- Enomoto, N. et al., 2002. Thalidomide prevents alcoholic liver injury in rats through suppression of Kupffer cell sensitization and TNF-alpha production. *Gastroenterology*, 123(1), pp.291–300. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12105857> [Accessed April 14, 2018].
- Epstein, M.P. & Kaplan, M.M., 2004. A pilot study of etanercept in the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Digestive diseases and sciences*, 49(1), pp.1–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14992426> [Accessed September 29, 2018].
- Färkkilä, M. et al., 2004. Metronidazole and ursodeoxycholic acid for primary sclerosing cholangitis: a randomized placebo-controlled trial. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 40(6), pp.1379–86. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.20457> [Accessed October 6, 2018].
- Fickert, P. et al., 2006. 24-norUrsodeoxycholic acid is superior to ursodeoxycholic acid in the treatment of sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology*, 130(2), pp.465–81. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508505021748> [Accessed November 30, 2015].
- Fickert, P. et al., 2017. norUrsodeoxycholic Acid Improves Cholestasis in Primary Sclerosing Cholangitis. *Journal of Hepatology*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827817320457> [Accessed June 5, 2017].
- Fickert, P., Moustafa, T. & Trauner, M., 2007. Primary sclerosing cholangitis--the arteriosclerosis of the bile duct? *Lipids in health and disease*, 6, p.3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17254334>.
- Figg, W.D. et al., 2009. A Double-Blind Randomized Crossover Study of Oral Thalidomide Versus Placebo for Androgen Dependent Prostate Cancer Treated With Intermittent Androgen Ablation. *The Journal of Urology*, 181(3), pp.1104–1113. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167733> [Accessed June 6, 2017].

- Fujita, J. et al., 2001. Thalidomide and its analogues inhibit lipopolysaccharide-mediated induction of cyclooxygenase-2. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 7(11), pp.3349–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11705847> [Accessed January 16, 2018].
- Govindarajan, R., 2002. Irinotecan/thalidomide in metastatic colorectal cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 16(4 Suppl 3), pp.23–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12014864> [Accessed January 16, 2018].
- Grant, A.J. et al., 2001. MAdCAM-1 expressed in chronic inflammatory liver disease supports mucosal lymphocyte adhesion to hepatic endothelium (MAdCAM-1 in chronic inflammatory liver disease). *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 33(5), pp.1065–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11343233> [Accessed May 19, 2016].
- Haruta, I. et al., 2010. Long-term bacterial exposure can trigger nonsuppurative destructive cholangitis associated with multifocal epithelial inflammation. *Laboratory Investigation*, 90(4), pp.577–588. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/labinvest.2010.40> [Accessed January 27, 2017].
- He, H. et al., 2011. Combination of retinoic acid and ursodeoxycholic acid attenuates liver injury in bile duct-ligated rats and human hepatic cells. *Hepatology*, 53(2), pp.548–557. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=He+H%2C+Mennone+A%2C+Boyer+JL%2C+Cai+SY.+Combination+of+retinoic+acid+and+ursodeoxycholic+acid+attenuates+liver+injury+in+bile+duct+ligated+rats+and+human+hepatic+cells> [Accessed January 27, 2017].
- Heinrich, P.C. et al., 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal*, 374(Pt 1), pp.1–20. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1223585&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 15, 2015].
- Hirschfield, G.M. et al., 2015. Efficacy of obeticholic acid in patients with primary biliary cirrhosis and inadequate response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology*, 148(4), p.751–61.e8. Available at:

- <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508514015303> [Accessed January 27, 2017].
- Hospital, J.R., 2005. Review article : current management of primary sclerosing cholangitis. , pp.933–948.
- Hov, J.-R., Boberg, K.-M. & Karlsen, T.-H., 2008. Autoantibodies in primary sclerosing cholangitis. *World journal of gastroenterology : WJG*, 14(24), pp.3781–3791.
- Jacques, V. et al., 2015. Differentiation of antiinflammatory and antitumorigenic properties of stabilized enantiomers of thalidomide analogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(12), p.201417832. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25775521> [Accessed June 6, 2017].
- Ji, S.-G. et al., 2016. Genome-wide association study of primary sclerosing cholangitis identifies new risk loci and quantifies the genetic relationship with inflammatory bowel disease. *Nature Genetics*.
- Keifer, J.A. et al., 2001. Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of IkappaB kinase activity. *The Journal of biological chemistry*, 276(25), pp.22382–7. Available at: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M100938200> [Accessed January 16, 2018].
- Kim, W.R. et al., 1999. The relative role of the Child-Pugh classification and the Mayo natural history model in the assessment of survival in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*, 29(6), pp.1643–1648.
- Knox, T.A. & Kaplan, M.M., 1994. A double-blind controlled trial of oral-pulse methotrexate therapy in the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*, 106(2), pp.494–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8299916> [Accessed September 29, 2018].
- Krasinskas, A.M. et al., 2007. Helicobacter pylori may play a contributory role in the pathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *Digestive diseases and sciences*, 52(9), pp.2265–70. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10620-007-9803-7> [Accessed October 6, 2018].
- LaRusso, N.F. et al., 2006. Primary sclerosing cholangitis: summary of a workshop.

Hepatology, 44(3), pp.746–764. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16941705>.

Lemoine, S. et al., 2018. Primary sclerosing cholangitis response to the combination of fibrates with ursodeoxycholic acid: French-Spanish experience. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210740118301219> [Accessed September 29, 2018].

Lichtman, S.N. et al., 1991. Biliary tract disease in rats with experimental small bowel bacterial overgrowth. *Hepatology*, 13(4), pp.766–772. Available at:
<http://doi.wiley.com/10.1002/hep.1840130425> [Accessed January 27, 2017].

Lim, Y.K., Keating, J.P. & Steele, R., 2015. Successful use of thalidomide in severe gastrointestinal Behçet's disease. *ANZ Journal of Surgery*, 85(6), pp.496–496. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26031928> [Accessed January 16, 2018].

Lindkvist, B. et al., 2010. Incidence and prevalence of primary sclerosing cholangitis in a defined adult population in Sweden. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(2), pp.571–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683956> [Accessed February 3, 2016].

Lindström, L. et al., 2012. High dose ursodeoxycholic acid in primary sclerosing cholangitis does not prevent colorectal neoplasia. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 35(4), pp.451–7. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22221173> [Accessed March 8, 2016].

Little, R.F. et al., 2000. Activity of Thalidomide in AIDS-Related Kaposi's Sarcoma. *Journal of Clinical Oncology*, 18(13), pp.2593–2602. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10893291> [Accessed January 17, 2018].

Loftus, E. et al., 1996. Primary sclerosing cholangitis is associated with nonsmoking: A case- control study. *Gastroenterology*, 110(5), pp.1496–1502. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508596002211> [Accessed March 3, 2016].

Lv, P. et al., 2007. Reversal effect of thalidomide on established hepatic cirrhosis in rats via inhibition of nuclear factor-kappaB/inhibitor of nuclear factor-kappaB

- pathway. *Archives of medical research*, 38(1), pp.15–27. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S018844090600333X> [Accessed January 17, 2018].
- MacCarty, R.L. et al., 1983. Primary sclerosing cholangitis: findings on cholangiography and pancreatography. *Radiology*, 149(1), pp.39–44. Available at: http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiology.149.1.6412283?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed [Accessed March 7, 2016].
- Mauad, T.H. et al., 1994. Mice with homozygous disruption of the mdr2 P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *The American journal of pathology*, 145(5), pp.1237–45. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1887434&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Molodecky, N.A. et al., 2011. Incidence of primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 53(5), pp.1590–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21351115> [Accessed February 3, 2016].
- Mondello, S. et al., 2009. THALIDOMIDE SUPPRESSES SCLEROSING ENCAPSULATING PERITONITIS IN A RAT EXPERIMENTAL MODEL. *Shock*, 32(3), pp.332–339. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19680075> [Accessed January 17, 2018].
- Moreira, B.A.L. et al., 1993. Thalidomide Exerts Its Inhibitory Action on Tumor Necrosis Factor α by Enhancing mRNA Degradation By Andre L. Moreira,* Elizabeth P. Sampaio,* S Antonina Zmuidzinas,* Paula Frindt,* Kendall A. Smith,* and Gilla Kaplan* . , 177(June), pp.6–11.
- Muir, A.J. et al., 2018. Simtuzumab for Primary Sclerosing Cholangitis: Phase 2 Study Results With Insights on the Natural History of the Disease. *Hepatology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30153359> [Accessed September 29, 2018].
- Murphy, K., Travers, P. & Walport, M., 2008. *Janeway Immunologie*,

- Neuschwander-Tetri, B.A. et al., 2015. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*, 385(9972), pp.956–65. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614619334> [Accessed January 27, 2017].
- O'Mahony, C.A. & Vierling, J.M., 2006. Etiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *Seminars in liver disease*, 26(1), pp.3–21. Available at: <https://www.thieme-connect.com/DOI/DOI?10.1055/s-2006-933559> [Accessed May 18, 2016].
- Olsson, R. et al., 1998. Bile duct bacterial isolates in primary sclerosing cholangitis: a study of explanted livers. *Journal of hepatology*, 28(3), pp.426–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9551680> [Accessed October 6, 2018].
- Olsson, R. et al., 2005. High-dose ursodeoxycholic acid in primary sclerosing cholangitis: a 5-year multicenter, randomized, controlled study. *Gastroenterology*, 129(5), pp.1464–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16285948> [Accessed March 8, 2016].
- Ponsioen, C.Y. et al., 2002. A survey of infectious agents as risk factors for primary sclerosing cholangitis: are Chlamydia species involved? *European journal of gastroenterology & hepatology*, 14(6), pp.641–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12072598> [Accessed October 6, 2018].
- Ponsioen, C.Y. et al., 2016. Surrogate endpoints for clinical trials in primary sclerosing cholangitis: Review and results from an International PSC Study Group consensus process. *Hepatology*, 63(4), pp.1357–1367. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26418478> [Accessed October 6, 2018].
- Popov, Y. et al., 2005a. Mdr2 (Abcb4)^{-/-} mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes. *Journal of hepatology*, 43(6), pp.1045–54. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827805004885> [Accessed May 26, 2016].
- Popov, Y. et al., 2005b. Mdr2 (Abcb4)^{-/-} mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes. *Journal of*

- hepatology*, 43(6), pp.1045–54. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16223543> [Accessed October 11, 2013].
- Poropat, G. et al., 2011. Bile acids for primary sclerosing cholangitis. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*, (1), p.CD003626.
- Rudolph, G. et al., 2007. The incidence of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis after long-time treatment with ursodeoxycholic acid. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 19(6), pp.487–91. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17489059> [Accessed March 8, 2016].
- Santiago, P., Scheinberg, A.R. & Levy, C., 2018. Cholestatic liver diseases: new targets, new therapies. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 11, p.175628481878740. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30159035> [Accessed September 29, 2018].
- Schrumpf, E. & Boberg, K.M., 2003. Hepatic and extrahepatic malignancies and primary sclerosing cholangitis. *Gut*, 52(2), p.165. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1774978&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 1, 2016].
- Sekido, H. et al., 1999. Liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*, 6(4), pp.373–6. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10664284> [Accessed May 16, 2016].
- Singh, S. & Talwalkar, J. a, 2013. Primary sclerosing cholangitis: diagnosis, prognosis, and management. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 11(8), pp.898–907. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23454027> [Accessed October 6, 2013].
- Smit, J.J.M. et al., 1993. Homozygous disruption of the murine MDR2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*, 75(3), pp.451–462. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867493903809> [Accessed May 26, 2016].
- Song, T. et al., 2016. Thalidomide represses inflammatory response and reduces radiculopathic pain by inhibiting IRAK-1 and NF- B/p38/JNK signaling. *Journal of*

- Neuroimmunology*, 290, pp.1–8. Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165572815300746?via%3Dihub> [Accessed March 9, 2019].
- Tabata, C. et al., 2007. Thalidomide prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(1), pp.708–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17579094> [Accessed January 17, 2018].
- Talwalkar, J.A. et al., 2005. Mycophenolate Mofetil for the Treatment of Primary Sclerosing Cholangitis. *The American Journal of Gastroenterology*, 100(2), pp.308–312. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15667487> [Accessed September 29, 2018].
- Terg, R. et al., 2008. Prevalence of primary sclerosing cholangitis in patients with ulcerative colitis and the risk of developing malignancies. A large prospective study. *Acta gastroenterologica Latinoamericana*, 38(1), pp.26–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18533354> [Accessed March 3, 2016].
- Van Thiel, D.H. et al., 1995. Tacrolimus (FK 506), a treatment for primary sclerosing cholangitis: results of an open-label preliminary trial. *The American journal of gastroenterology*, 90(3), pp.455–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7532912> [Accessed September 29, 2018].
- Triantos, C.K. et al., 2011. Meta-analysis: ursodeoxycholic acid for primary sclerosing cholangitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 34(8), pp.901–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21883323> [Accessed March 8, 2016].
- Tse, C.S. et al., 2018. Effects of vedolizumab, adalimumab and infliximab on biliary inflammation in individuals with primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 48(2), pp.190–195. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/apt.14829> [Accessed September 29, 2018].
- Vleggaar, F.P., Monkelbaan, J.F. & van Erpecum, K.J., 2008. Probiotics in primary sclerosing cholangitis: a randomized placebo-controlled crossover pilot study. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 20(7), pp.688–92. Available at: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00042737-200807000-00016>

[Accessed October 6, 2018].

Wang, D. et al., 2016. Thalidomide treatment in cutaneous lesions of systemic lupus erythematosus: a multicenter study in China. *Clinical Rheumatology*, 35(6), pp.1521–1527. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27097914> [Accessed January 16, 2018].

Wolpe, S.D. et al., 1989. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(2), pp.612–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=286522&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 30, 2015].

Yamada, S. et al., 1994. Small duct cholangitis induced by N-formyl L-methionine L-leucine L-tyrosine in rats. *Journal of gastroenterology*, 29(5), pp.631–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8000512> [Accessed January 27, 2017].

8. Danksagung

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Ehlken, Huber, Herkel und Schramm, des Sonderforschungsbereichs 841 und der Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf.

Ich danke auch meinen Eltern, meinem Bruder, meinen Freunden und Kommilitonen, die mich auf diesem Weg unterstützt und begleitet haben.

Zudem danke Ich meiner ehemaligen Biologielehrerin Silke Reinhardt, ohne deren Geduld und Engagement es mich vermutlich niemals in die Naturwissenschaften verschlagen hätte.

Insbesondere gilt mein Dank meinem Betreuer Dr. Hanno Ehlken und Dr. Raluca Wroblewski für ihre stete Hilfe in Rat und Tat, ohne die diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre.

9. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.



Unterschrift: