

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Prof. Dr. A. W. Lohse

Einfluss einer intestinalen Entzündung auf die Entwicklung von
Lebererkrankungen im Mausmodell

DISSERTATION

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

vorgelegt von:

Franziska Lara Mathies
aus Hamburg

Hamburg 2017

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

15.05.2017

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. med. Samuel Huber

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

Prof. Dr. Gisa Tiegs

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Primär sklerosierende Cholangitis	1
1.2	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	5
1.3	Mausmodelle	8
1.4	Arbeitshypothesen und Fragestellung	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Puffer und Medien	17
2.2	Versuchstiere	18
2.3	Kolitis-Induktion	19
2.4	Endoskopie	22
2.5	Blut- und Organentnahme	23
2.6	Zellisolation	24
2.7	Durchflusszytometrie	25
2.8	Histologie	28
2.9	Klinische Chemie	29
2.10	Nachweis bakterieller Translokation	29
2.11	RNA-Analyse	30
2.12	Statistische Auswertung	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Akute DSS-Kolitis in C57Bl/6-Mäusen	34
3.2	Chronische DSS-Kolitis in C57Bl/6-Mäusen	41
3.3	Chronische DSS-Kolitis in Mäusen mit genetischer Leberpathologie	48
3.4	Kolitis nach adoptiven T-Zell-Transfer	57
4	Diskussion	65
4.1	Hepatische Akkumulation von Immunzellen durch Kolitis	65
4.2	Bakterielle Translokation als vermittelnder Mechanismus	67
4.3	Hepatischer Phänotyp im alternativen Kolitis-Modell	68
4.4	Mildere Lebererkrankung in <i>Mdr2</i> ^{-/-} - Mäusen nach Kolitis	70

4.5	Zusammenfassung	74
4.6	Abstract	75
5	Abkürzungsverzeichnis	76
6	Literaturverzeichnis	78
7	Danksagung	111
8	Lebenslauf	112
9	Eidesstattliche Versicherung	113

1. Einleitung

1.1 Primär sklerosierende Cholangitis

Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) ist eine chronisch fortschreitende Leberkrankung unklarer Ätiologie. Sie ist gekennzeichnet durch eine Entzündung der intra- sowie extrahepatischen Gallengänge und eine obliterierende konzentrische periduktale Fibrose [1, 2]. Die fortschreitende Zerstörung der Gallengänge kann über eine Leberzirrhose bis zu einem Leberversagen führen. Zudem besteht ein erhöhtes Risiko für hepatobiliäre und kolorektale Neoplasien [3]. Aufgrund der eingeschränkten Therapieoptionen stellt die PSC noch immer eine schwere Erkrankung dar, in deren Verlauf viele Patienten eine Lebertransplantation benötigen [4, 5].

Epidemiologie

Die Inzidenz der PSC liegt bei 0,9-1,3 Fällen auf 100.000 Einwohner pro Jahr. Die Prävalenz beträgt 8,5-14,2 Patienten auf 100.000 Einwohner [6, 7, 8]. Das mittlere Diagnosealter liegt bei 30-40 Jahren [9, 10].

Es besteht eine deutliche Korrelation zwischen PSC und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), welche regional unterschiedlich ausgeprägt ist. In den USA und Nordeuropa sind 60-80% aller PSC-Patienten ebenfalls an einer CED erkrankt, in Südeuropa liegt der Anteil bei 50% und in Asien bei 20-35% [11, 12, 13, 14, 15, 16]. Dabei ist der überwiegende Teil der PSC-CED-Patienten an einer Colitis ulcerosa (*Ulcerative colitis*, UC) erkrankt, bei 5,7-13,6% besteht ein Morbus Crohn (*Crohn's disease*, CD) [13, 7, 6]. In einer aktuellen kanadischen Studie wurde in einem Kollektiv von PSC-Patienten hingegen ein ausgeglichenes Verhältnis von CD- und UC-Erkrankungen gefunden. Als mögliche Ursachen kommen eine Zunahme der CD-Inzidenz insgesamt beziehungsweise die breitere Verfügbarkeit sowie Anwendung sensitiverer diagnostischer Verfahren wie der Magnetresonanztomographie in Frage [8]. Umgekehrt ist die Korrelation von PSC und CED weniger stark ausgeprägt: bis zu 5% aller UC-Patienten sind ebenfalls an einer PSC erkrankt, für CD-Patienten liegt die Rate bei 3,4% [17].

Die Entzündungsaktivität im Gastrointestinaltrakt bei PSC-CED-Patienten zeigt ein spezifisches Muster im Vergleich zu CED-Patienten ohne PSC: In mehreren Studien ließ sich

bei PSC-CED-Patienten häufiger eine Entzündung über das Kolon hinaus bis in das Ileum (*Backwash ileitis*) sowie ein entzündungsfreies Rektum (*Rectal sparing*) nachweisen. Zudem besteht bei 87% der PSC-CED-Patienten eine Pankolitis im Vergleich zu 54% der CED-Patienten ohne PSC. Insgesamt liegt bei PSC-CED-Patienten zudem eine mildere Entzündungsaktivität der Kolitis vor [18, 19]. Diese Abmilderung könnte als Folge der Funktionseinschränkung der Leber durch die PSC auftreten [20]. Die Studien von Boonstra *et al.* sowie Joo *et al.* bestätigen das häufigere Vorkommen der Pankolitis sowie die verringerte Entzündungsaktivität bei PSC-CED-Patienten. In den untersuchten Populationen weisen die Patienten aber weder öfter eine *Backwash ileitis* noch ein *Rectal sparing* auf als CED-Patienten ohne PSC [16, 21].

Ob PSC-CED Patienten zudem im Vergleich zu PSC-Patienten ebenfalls ein spezifisches Erkrankungsmuster der Leber zeigen, ist unklar. Während Rabinovitz *et al.* eine Häufung von kombiniertem intra- und extrahepatischer Krankheitsausbreitung bei PSC-CED-Patienten zeigen, stellen weitere Studien keinen Unterschied von PSC- und PSC-CED-Patienten bezüglich klinischem und radiologischem Erscheinungsbild der PSC oder Überlebensrate fest [22, 13, 23, 24]. Passend dazu beeinflusst eine Kolektomie nicht den Verlauf der Lebererkrankung bei PSC-CED-Patienten [25]. Marelli *et al.* wiesen hingegen eine Assoziation von einer aktiveren Kolitis mit einer milderen Lebererkrankung und umgekehrt nach [26]. Gleichzeitig scheint eine Rezidiv-PSC nach erfolgreicher Lebertransplantation seltener bei Patienten mit Kolektomie aufzutreten [27, 28].

Pathogenese

Die exakte Pathogenese der PSC ist ungeklärt. Erschwert wird die Interpretation klinisch erhobener Befunde dadurch, dass die Erkrankung in der Regel in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird, in dem in der Leber bereits Vernarbungen und Stenosen der Gallengänge bestehen. Für die jeweiligen klinischen Aspekte ist dadurch unklar, ob sie kausal die Erkrankung auslösen oder eine Folge der fortgeschrittenen Erkrankung darstellen.

Diskutierte pathogenetische Konzepte gehen von einer multifaktoriellen Genese aus, für die eine genetische Suszeptibilität auf äußere Trigger, eine vermehrte bakterielle Translokation aus dem Darm (*Leaky-gut-Hypothese*), eine fehlgeleitete Lymphozyten-Migration (*Abberant-homing-Hypothese*) sowie Fehlfunktionen des Gallensäuremetabolismus relevant sind [2, 29]. Die Assoziation zu CED sowie zu bestimmten Haplotypen des humanen Leukozytenantigen-Systems (HLA-System) bei fehlendem Ansprechen auf immunsuppressive Medikamente weisen auf eine immun-vermittelte, aber nicht klassische autoimmune Erkrankung hin [30].

Genetische Risikofaktoren

Es besteht ein erhöhtes PSC-Risiko für erstgradige Verwandte von PSC-Patienten, was eine genetische Prädisposition wahrscheinlich macht [31]. Genomweite Assoziationsstudien an PSC-Patienten haben zahlreiche Risiko-Loci identifiziert, welche den Bereichen Entzündung, Cholangiozytenfunktion, Fibrose und Karzinogenese zugeordnet werden können [32]. Die klinische Relevanz der entdeckten Korrelationen muss allerdings jeweils in weiteren Studien bestätigt werden. Eine deutliche Assoziation zwischen genetischen Varianten und PSC ist im HLA-System auf Chromosom 6p21 nachweisbar. Aufgrund des starken *linkage disequilibrium* im HLA-Bereich ist eine genaue Identifikation der Suszeptibilitätsgene allerdings bisher nicht gelungen [33].

Leaky-gut-Hypothese

Die *Leaky-gut*-Hypothese postuliert eine vermehrte Translokation von Bakterien oder bakteriellen Bestandteilen aus dem durch Entzündungsvorgänge in seiner Barrierefunktion gestörten Darm über das portalvenöse System in die Leber. Die Stimulation von Makrophagen, insbesondere Kupffer-Zellen, sowie die Freisetzung von Zytokinen könnten zur Cholangitis und im Rahmen der damit verbundenen Wundheilungsreaktion zur periduktalen Fibrose führen [34]. In verschiedenen tierexperimentellen Studien konnten eine bakterielle Überwucherung des Dünndarms, die Applikation von E.coli-Bestandteilen während einer Kolitis sowie die direkte Injektion bakterieller Bestandteile in die Pfortader PSC-ähnliche histopathologische Veränderungen der Leber hervorrufen [35, 36].

Hinweise für den Einfluss einer bakteriellen Translokation auf die Pathogenese der PSC stammen auch aus humanen Proben: Im Lebergewebe von PSC-Patienten konnte immunhistochemisch 16S-rRNA als Bestandteil von Bakterien nachgewiesen werden [37]. Mikrobiologische Kulturen aus Gallenflüssigkeit zeigen bei PSC-Patienten öfter eine bakterielle Besiedlung als bei anderen chronischen Lebererkrankungen, wie beispielsweise der primär biliären Zirrhose [38]. Aus explantierten Lebern isolierte biliäre Epithelzellen von PSC-Patienten zeigen zudem *in vitro* eine überempfindliche Reaktion auf Endotoxin-Stimulation ohne Toleranzentwicklung nach wiederholter Stimulation [39].

Studien zur antibiotischen Therapie von PSC-Patienten variieren in Größe und verwendetem Therapieschema, konnten aber in einigen Fällen eine Besserung serologischer und klinischer Marker erreichen. Unklar bleibt der prognostische Langzeiteffekt und das optimale Therapieregime [35].

Auch eine abberante Immunreaktion auf die kommensale Darmflora könnte zur Pathogenese beitragen; so lassen sich bei PSC-Patienten häufiger atypische perinukleäre Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper (p-ANCA) nachweisen, welche mit dem humanen β -Tubulin Isotype 5 und einem bakteriellem Protein kreuzreaktiv sind [40].

Abberant-homing-Hypothese

Aufgrund der engen Assoziation von PSC und CED sowie der Tatsache, dass eine PSC auch nach bereits erfolgter Kolektomie auftreten kann, ist die alternative Hypothese des *Abberant Homings*, also der fehlgeleiteten enterohepatischen Migration von T-Zellen postuliert worden: Im darmassoziierten lymphatischen Gewebe (*gut associated lymphoid tissue*, GALT) geprägte Gedächtniszellen könnten in die Leber migrieren, hier aktiviert werden und eine Entzündungsreaktion hervorrufen [41]. So weisen PSC-Patienten auf dem Epithel ihrer Lebergefäße eine gesteigerte Expression von CCL25 (*C-C motif chemokine ligand 25*) sowie dem Adressin MADCAM1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule 1*) auf, welche normalerweise das Homing von Lymphozyten in den Darm beziehungsweise das GALT ermöglichen. Aus Lebergewebe von PSC-Patienten isolierte T-Zellen exprimieren zudem mit dem Integrin $\alpha 4\beta 7$ und CCR9 (*C-C chemokine receptor type 9*) für eine Aktivierung im GALT typische Oberflächenmarker, welche nach einer Aktivierung in der Leber nicht induziert werden [42, 43]. Unklar ist, wodurch die veränderte Expression der Adhäsionsmoleküle in der Leber hervorgerufen wird und ob sie im Rahmen der generellen chronischen Entzündungsreaktion auftritt, da eine gesteigerte MADCAM1-Expression auch in anderen Lebererkrankungen vorliegt, welche mit Entzündungsreaktionen einhergehen [44].

Gallensäuremetabolismus

Das Konzept der *toxischen Galle* beruht auf der Beobachtung, dass in verschiedenen Tiermodellen durch Veränderungen der Gallenflüssigkeit eine sklerosierende Cholangitis induziert wird, welche histologisch der humanen Erkrankung ähnelt [36]. Insbesondere das *Knockout*-Modell des *Multi drug resistance gene 2* (*Mdr2*^{-/-}-Modell) wird in diesem Zusammenhang untersucht: Durch die Störung einer kanalikulären Phospholipid-Flippase wird in diesem Modell die physiologische Micellenbildung der Galle gestört, es kommt zu einer Entzündungsreaktion und Fibrosierung der Leber (siehe auch Kapitel 1.3). Für das äquivalente humane Gen *MDR3* sind in PSC-Patienten allerdings keine genetischen Risikoallele bekannt [45, 46]. Humane *MDR3*-Defekte sind mit einem Spektrum an cholestatischen Erkrankungen wie der progressiven familiären intrahepatischen Cholestase sowie Schwangerschafts- beziehungsweise Arzneimittel-induzierter Cholestase assoziiert [47, 48]. Denkbar ist jedoch, dass Veränderungen des Gallensäuren-Metabolismus im Rahmen der auftretenden Cholestase sekundär an der PSC-Progression beteiligt sind.

Therapie der PSC

Aktuell existiert keine etablierte medikamentöse Therapie für Patienten mit PSC [4]. Die Gabe von Ursodeoxycholsäure (*Ursodeoxycholic acid*, UDCA) wurde in zahlreichen

Studien untersucht, ein eindeutiger Wirksamkeitsnachweis konnte bisher nicht erbracht werden. Niedrige bis mittlere Dosen UDCA zeigen eine Verbesserung der biochemischen Marker. Es bestehen Hinweise auf bessere klinische Verläufe, es konnte jedoch keine statistische Signifikanz erreicht werden. [49, 50, 51, 52]. Hohe Dosen (28-30 mg/kg) zeigten ein schlechteres klinisches Ergebnis bezüglich Notwendigkeit zur Lebertransplantation und Entwicklung von Ösophagusvarizen in der Behandlungsgruppe [53]. Zudem besteht ein erhöhtes Risiko für kolorektale Neoplasien in Patienten mit gleichzeitiger UC unter der hohen höheren UDCA-Dosierung; diese sollte dementsprechend nicht angewendet werden [4, 54].

Eine klassische immunsuppressive Therapie, wie sie beispielsweise bei autoimmuner Hepatitis eingesetzt wird, hat sich in Studien nicht als effektiv erwiesen [4]. NorUDCA, welches eine Verbesserung des Leberschadens durch eine obstruktiven Cholestase in verschiedenen Tiermodellen gezeigt hat, wird aktuell in klinischen Phase II Studien getestet [55, 56, 57]. Zur Symptomkontrolle kommen zusätzlich endoskopische Maßnahmen wie Ballondilatation beziehungsweise Stent-Implantationen zum Einsatz [58, 59].

Im fortgeschrittenen Stadium der PSC ist die Lebertransplantation eine Therapieoption, bis zu 40% aller Patienten benötigt sie im Zeitraum von 10-15 Jahre nach Symptombeginn [1, 3, 13, 60]. Auch nach Lebertransplantation kommt es bei 20% der Patienten innerhalb der ersten 5-10 Jahren zur Rezidiv-PSC. In verschiedenen Studien konnte eine Kolektomie vor oder gleichzeitig mit der Lebertransplantation die Rate an PSC-Rezidiven im Transplantat senken [28, 61].

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die Colitis ulcerosa (*Ulcerative colitis*, UC) sowie der Morbus Crohn (*Crohn's disease*, CD) sind die beiden häufigsten chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, zudem gehören auch seltenere Krankheitsbilder wie die kollagene und lymphozytäre Kolitis zu diesem Formenkreis. Bei bis zu 15 % der Patienten ist initial keine Zuordnung zu einem der Subtypen möglich [62]. Wie auch die PSC gehören die CED zu multifaktoriellen Erkrankungen. In genetischen Assoziationsstudien wurden zahlreiche Krankheitsrisiko-assoziierte genetische Regionen beziehungsweise Gene identifiziert, welche sich teilweise für UC und CD überlappen [63, 64]. Zu den ätiopathogenetisch diskutierten Faktoren gehören Barrieredefekte der Darmmukosa, eine gestörte Interaktion mit der physiologischen Darmflora sowie eine Dysregulation von angeborenem und erworbenem Immunsystem [65]. CED-Patienten weisen eine geringere Diversität des intestinalen Mikrobioms auf als gesunde Kontrollprobanden, zudem zeigt sich eine veränderte Komposition der Mikroflora. Ein spezifischer Erreger als Auslöser von CED konnte jedoch bisher nicht identifiziert werden [66, 67, 68].

Colitis ulcerosa

Die UC ist eine chronische, schubweise verlaufende Erkrankung, die durch eine sich von rektal nach oral kontinuierlich ausbreitende Entzündung der Darmmukosa gekennzeichnet ist. Typische klinische Zeichen sind blutige Diarrhoe, abdominelle Schmerzen sowie Tenesmen. Histopathologisch zeigen sich charakteristischerweise eine Störung der Kryptenarchitektur, eine Infiltration der Lamina propria sowie Erosionen der Darmschleimhaut, wobei lediglich Mukosa und Submukosa, jedoch nicht die tieferen Wandschichten des Darms betroffen sind [62]. Die Ausbreitung kann von einer Proktitis bis zu einer Pan-kolitis reichen [69]. Das Risiko eines kolorektalen Karzinoms ist für UC-Patienten zudem erhöht [70].

Die Häufigkeit der UC schwankt regional, in Europa ist sie mit einer Prävalenz von bis zu 505 Erkrankten pro 100000 Einwohnern und einer Inzidenz von bis zu 12,7 Neuerkrankten pro 100000 Personnenjahren weltweit am höchsten [71, 72]. Die exakte Ätiopathogenese ist unklar. Neben einem erhöhten genetischen Risiko bei Erkrankung eines erstgradigen Verwandten [73, 74, 75] spielen Umweltfaktoren eine Rolle: Dabei sind Rauchen sowie eine bis zum Jugendalter erfolgte Appendektomie protektive Faktoren [76, 77, 78, 79]. Eine gastrointestinale Infektionen mit bestimmten Keimen erhöht hingegen das Erkrankungsrisiko, wobei eine Veränderung des Mikrobioms durch die akute Infektion als möglicher Mechanismus denkbar ist [80, 81].

Eine Modellvorstellung der Pathogenese der UC umfasst folgende Faktoren: Der physiologische Schutz der Darmwand durch eine für Bakterien nicht durchlässige Schleimschicht ist während der akuten Entzündungsschübe der UC gestört. Es kommt zu einer verminderten Sekretion des Mucin 2-Proteins, einer der Hauptkomponenten des intestinalen Schleims; zudem wird die Schleimschicht für die kommensalen Bakterien penetrierbar [82, 83]. Die erhöhte Aufnahme luminaler Antigene könnte über eine Erkennung mittels *Toll-like* Rezeptoren (TLR), Makrophagen und dendritische Zellen (*Dendritic cells*, DC) von tolerogenem in einen aktivierten Zustand versetzen. UC-Patienten zeigen eine erhöhte Anzahl an aktivierten DC in der Lamina propria, welche eine verstärkte Expression von TLR2 sowie TLR4 aufweisen, was zu einer veränderten Interaktion mit der intestinalen Flora führen könnte [84]. Unklar ist, in welchem Maße diese klinischen Beobachtungen sekundär im Rahmen der Entzündung auftreten oder kausal für die UC sind. Die Risiko-Assoziation von UC-Patienten zu Polymorphismen von Genen, welche in Verbindung mit der epithelialen Barrierefunktion stehen, weisen allerdings auf eine primäre Störung hin [64].

Neben der angeborenen Abwehr gehören auch Mechanismen des adaptiven Immunsystems zu möglichen pathogenetischen Faktoren der UC: Nicht-klassische natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) könnten über eine erhöhte Produktion von Interleukin-13 (IL-13)

eine atypische Th2-Antwort hervorrufen, was zu einer Störung der *Tight Junctions* und Epithelzellapoptosen führt [85, 86].

Die medikamentösen Therapieoptionen der UC umfassen aktuell abhängig vom Schweregrad Aminosalizylate, Kortikosteroide, Azathioprin, Ciclosporin und *Biologicals* wie TNF- α - und Integrin-Antagonisten. Bei Therapieresistenz oder nicht beherrschbaren Komplikationen ist eine Kolektomie indiziert, welche die einzige kurative Therapieoption darstellt und in etwa einem Viertel der Fälle im Laufe der Erkrankung nötig ist [87, 88].

Morbus Crohn

Beim Morbus Crohn handelt es sich um eine schubweise verlaufende, transmurale Entzündung des Magen-Darm-Traktes, welche jeden Abschnitt des Verdauungssystems befallen kann und häufig einen segmentalen Befall zeigt. Klinisch kommt es zu abominellen Schmerzen, Diarrhoe, Fieber und Abgeschlagenheit. Häufiger als bei der UC treten auch extraintestinale Manifestationen wie Arthritiden und Hauterscheinungen auf [89]. Histologisch können eine diskontinuierlichen Störung der Kryptenarchitektur, Lymphozyten- und Plasmazellinfiltrate sowie bei einem Teil der Patienten auch epitheloidzellige Granulome auftreten. Diese sind relativ spezifisch, aber wenig sensitiv für CD [90]. Die jährliche Inzidenz von CD beträgt in Europa bis zu 12,7 und in Nordamerika bis zu 20,2 Neuerkrankungen pro 100000 Personenjahre. Die Prävalenz liegt bei bis zu 332 Erkrankten pro 100000 Einwohner [72].

Die Pathogenese des CD ist multifaktoriell; vermutlich liegt eine durch Umweltfaktoren getriggerte gestörte Reaktion des adaptiven sowie angeborenen Immunsystems auf eine gestörte Mikroflora in genetisch suszeptiblen Individuen vor. Die familiäre Häufung von CD-Fällen sowie die konkordante Ausprägung bei 25-35% von monozygoten Zwillingen sind Hinweise auf eine genetische Komponente [91, 92, 93]. Vorhergehender Tabak-Konsum sowie gastrointestinale Infektionen erhöhen als Umweltfaktoren das Risiko für eine spätere Erkrankung [77, 80, 94]. Weitere diskutierte Pathomechanismen umfassen Störungen der intestinale Barriere, der Erreger-Erkennung durch *pattern recognition receptor* sowie der Paneth-Zell-Funktion und ein Ungleichgewicht in der T-Zell-Antwort [95].

Eines der wichtigsten in mehreren genomweiten Assoziationsstudien identifizierten Risikogene ist das *nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*-Gen (*NOD2*). *NOD2* wird auf myeloiden Zellen und intestinalen Epithelzellen exprimiert und ist an der Erkennung von Bakterien durch das angeborene Immunsystem beteiligt [96, 97]. Das *NOD2*-Risiko-Gen für CD ist mit einer verminderten Produktion von α -Defensin durch Paneth-Zellen assoziiert, wodurch die Abwehr und Regulation der kommensalen Mikrobiota gestört wird [98]. *Nod*^{-/-}-Mäuse weisen eine veränderte Komposition ihrer Mikroflora auf, zudem kann die *NOD2*-Expression und Funktion in intestinalen Epithelzellen durch Zigarettenrauch verändert werden [99, 100]. Paneth-Zellen von CD-Patienten mit einer

Variante des Autophagie-assoziierte *ATG17L*-Gens waren zudem dysmorph und in ihrer Funktion eingeschränkt [101].

DC sind essentiell an der Regulation von Toleranz und Aktivierung des Immunsystems beteiligt und stellen eine Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem her [102]. Sie weisen in CD-Patienten eine veränderte Expression von TLR2 sowie TLR4 auf, ihre Verteilung und ihr Phänotyp korreliert mit der Erkrankungsschwere [84, 103, 104]. Auch die verminderte Fähigkeit zur Aktivierung regulatorischer T-Zellen in CD-Patienten könnte zur Aufrechterhaltung der überschießenden Effektor-T-Zell-Reaktion beitragen [105]. Vermutlich ist das Ungleichgewicht von Effektor-T-Zellen an der Aufrechterhaltung der Entzündungsprozesse, nicht jedoch an der Initiierung beteiligt [95, 106].

Die Therapieoptionen des Morbus Crohn umfassen Kortikosteroide, Aminosalizylate, Immunsuppressiva wie Azathioprin oder Methotrexat sowie *Biologicals* wie TNF- α -, IL-12- sowie IL-23- und Integrin-Antagonisten. Im Gegensatz zur CU ist durch eine Kolektomie keine Heilung möglich, weswegen chirurgische Interventionen zurückhaltend, beispielsweise bei Fisteln oder selektivem Befall des terminalem Ileums, zum Einsatz kommen [89, 107, 108, 109].

1.3 Mausmodelle

Für die experimentelle Erforschung der PSC werden verschiedene Tiermodelle verwendet, die jeweils Teilaspekte der Erkrankung abbilden. Da von einer multifaktoriellen Genese auszugehen ist, existiert aktuell kein Modell, welches die Erkrankung komplett darstellen kann. Eine experimentelle Cholangitis kann durch Applikation von Chemikalien, durch den *Knock-out* spezifischer Gene, bakterielle beziehungsweise parasitäre Infektionen oder eine chirurgische biliäre Obstruktion induziert werden [110].

Analog zur PSC gibt es vielfältige Kolitis-Modelle, welche durch die Gabe von Chemikalien, den spezifischen *Knock-out* einzelner Gene, einer Infektion mit Krankheitserregern, einem Transfer von Immunzellen oder auch einer Kombination mehrerer Faktoren hervorgerufen werden. Obwohl zahlreiche Übereinstimmungen zwischen murinen und humanen Erkrankungsmechanismen bestehen, sind auch diese Modelle auf einzelne Teilaspekte limitiert [111, 112].

***Mdr2*^{-/-}-Modell**

Im *Mdr2*^{-/-}-Modell (alternativ: *ATP-binding cassette, sub-family B, member 4: Abcb4*) wird die Expression einer kanikulären Phospholipid-Flippase gestört, welche Phospholipide in die Gallenflüssigkeit transportiert. Durch den verminderten Phospholipidgehalt der Galle wird die physiologische Micellenbildung der Phospholipide mit Gallensäuren

verhindert, was zur Schädigung von Cholangiozyten führt [113]. Zudem kommt es durch eine Störung der *Tight Junctions* zur Leckage von Gallensäuren in die Portalfelder. Histologisch lassen sich im *Mdr2*^{-/-}-Modell eine periportale Entzündung, Fibrosierung sowie obliterative Cholangitis nachweisen. Das inflammatorische Infiltrat setzt sich aus CD11b⁺-Neutrophilen, sowie CD4- und CD8-T-Zellen zusammen. Im Gegensatz zu einigen anderen Cholangitis-Modellen ist im *Mdr2*^{-/-}-Modell keine Kolitis nachweisbar. Es tritt zudem keine erhöhte Dichte an Bakterien in Leber, Dünn- sowie Dickdarm oder eine veränderte Zusammensetzung der isolierten Bakterienspezies im Vergleich zur Kontrollgruppe auf [114]. Die physiologische intestinale Flora hat in diesem Cholangitis-Modell eine protektive Wirkung: Keimfrei gehaltene *Mdr2*^{-/-}-Mäuse zeigen im Vergleich zu konventionell gehaltenen Tieren sowohl schlechtere biochemische als auch histologische PSC-Marker, zudem besteht eine verstärkte Seneszenz der Cholangiozyten. Dieser Effekt ist *in vitro* durch die Applikation von UDCA, einem Metabolit der Mikroflora, reversibel [115].

DSS-Kolitis

Um den spezifischen Effekt einer Kolitis auf die Leber sowie die Entwicklung einer Cholangitis zu testen, wurde für diese Arbeit in Wildtypen sowie *Mdr2*^{-/-}-defizienten Mäusen eine Kolitis induziert. Durch die wiederholte Gabe von polymerem Natrium-Dextransulfat (*Dextran sodium sulfate*, DSS) kann, abhängig von der Applikationsdauer, eine akute beziehungsweise chronische Kolitis ausgelöst werden, welche durch Gewichtsverlust und blutige Diarrhoe gekennzeichnet ist [116]. Histologisch weist diese Kolitis Ulzerationen der Darmwand, einen Verlust von Krypten sowie entzündliche Infiltrate der Darmschleimhaut auf und ähnelt damit dem histologischen Bild der UC [117]. Als vermittelnde Mechanismen werden die Störung der *Tight Junctions* zwischen den Enterozyten sowie die toxische Wirkung von Komplexen aus mittelkettigen Fettsäuren mit DSS auf die Enterozyten angenommen, wodurch es zu einer Barrierestörung des Darmepithels und konsekutiv zu einer Entzündungsreaktion kommt [118, 119]. Zudem kommt es nach DSS-Gabe früh zu einer Störung der Struktur der inneren Schleimschicht, welche die Darmwand vor dem direkten Kontakt mit der kommensalen Flora schützt. Der Invasion von Entzündungszellen nach 3-4 Tagen geht eine bakterielle Penetration der inneren, physiologisch bakterien-freien, Schleimschicht voran [120]. Eine DSS-Kolitis lässt sich auch in Mäusen mit Störungen der adaptiven Immunabwehr hervorrufen [121]. In Wildtypen ist passend dazu die Entzündungsreaktion in der akuten Phasen primär durch die Zellen des angeborenen Immunsystems vermittelt und erst im weiteren Verlauf sind auch vermehrt CD3⁺-Zellen im Darmgewebe nachweisbar [122]. Nach oraler Gabe von DSS über mehrere Tage ist die Chemikalie nicht nur in intestinale Gewebe, sondern auch in weiteren Organen wie den mesenterischen Lymphknoten, der Milz sowie Leber nachweisbar [123].

Transfer-Kolitis

Um zwischen DSS- und Kolitis-spezifischen Effekten zu differenzieren, wurde ein alternatives Kolitis-Modell verwendet. Der adoptive Transfer von $CD4^+CD45RB^{high}$ T-Zellen in Mäuse ohne B- beziehungsweise T-Zellen ruft nach 5-8 Wochen eine Kolitis hervor und stellt ein weit verbreitetes Kolitis-Modell dar [124]. Um die Rolle von Th1- und Th17-Zellen zu untersuchen, können auch *in vitro* differenzierte IL-17A⁺-T-Zellen transferiert werden, welche eine ähnlich schwere beziehungsweise schwerere Kolitis hervorrufen. Nach Transfer bleibt lediglich ein kleiner Teil der Zellen stabil, während für die Entwicklung der Kolitis ein *Switch* in der Zytokinproduktion von IL-17A- zu einer IFN- γ -Produktion notwendig zu sein scheint [125].

Interaktion zwischen Kolitis und Leber im Mausmodell

Der Einfluss einer Kolitis auf die Leber wurde bereits in einigen Vorarbeiten untersucht: Nach vierwöchiger DSS-Gabe in Wildtypen konnten *Numata et al.* in 33% der Lebern periportale mononukleäre Zellinfiltrate sowie eine erhöhte Anzahl an Th1-Zellen nachweisen [126]. Eine chronische DSS-Kolitis über 5 bis 8 Zyklen ruft ebenfalls eine milde portale Inflammation in *Mdr^{+/-}*-Mäusen hervor, ohne die histologische Charakteristik einer sklerosierenden Cholangitis zu entwickeln [127]. Zusätzlich führt eine chronische DSS-Kolitis zu erhöhten Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IFN- γ und IL-6 im Pfortaderblut, es kommt zu einer verstärkten Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen (*Antigen presenting cell*, APC) in der Leber. In ASBT-OVA-Mäusen, welche Ovalbumin auf Gallengangsepithelien exprimieren, wird eine durch Transfer von Ovalbumin-spezifischen OT1-T-Zellen ausgelöste Cholangitis verstärkt [128].

1.4 Arbeitshypothesen und Fragestellung

Die Ätiologie der PSC ist bislang nicht abschließend geklärt. Da die PSC regelhaft erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird, ist für die meisten klinisch erhobenen Befunde unklar, ob diese die Erkrankung verursachen oder ihre sekundäre Folgeerscheinung sind. Die Entwicklung einer PSC-Erkrankung ist in Nordeuropa in 60-80% mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung assoziiert. Ziel dieser Arbeit ist daher, den Einfluss einer Kolitis auf die Entstehung einer Leberpathologie in gesunden Mäusen zu evaluieren. Anschließend wird der Effekt auf eine bereits bestehende, PSC-ähnliche Leberpathologie getestet. Für beide Fragestellungen wird geprüft, ob die Translokation von Bakterien über die Pfortader in die Leber als vermittelnder Mechanismus in Frage kommt. Im zweiten Teil der Arbeit wird mit Hilfe eines alternativen Kolitis-Modells überprüft, welche der hepatischen Veränderungen modellunabhängig auf die Darmentzündung zurückzuführen sind.

2. Material und Methoden

Gerät	Hersteller
CO ₂ -Inkubator MCO-19AIC (UVH)	Sanyo Medical AG, Etten Leur, Niederlande
Durchflusszytometer: LSR II	BD Biosciences, Heidelberg
Endoskop: <i>ColoView-System</i>	Karl Storz, Tuttlingen
FACS Aria III	BD Biosciences, Heidelberg
MACS Magnet: QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnet für RNA-Isolation: DynaMag-2	Life Technologies, Darmstadt
Mikroskop Keyence BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg
Mikrotom CUT 5062	SLEE Medical, Mainz
Neubauer Zählkammer <i>bright line</i>	Marienfeld Superior, Lauda Königshofen
Pipetten 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Real-Time-PCR-Cycler: <i>Step One Plus</i>	Life Technologies, Darmstadt
Reine Werkbank HA 2472 GS	Heraeus, Hanau
Spektrophotometer Nanodrop 2000	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Thermozykler C100 Touch	Bio-Rad Laboratories, München
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Wasserbad WNB	Memmert, Schwabach
Zentrifuge: Centrifuge 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge: Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

Bei allen verwendeten Standard-Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Reaktionsröhrchen oder 96-Well-Platten handelte es sich um Plastikwaren der Firmen Eppendorf (Hamburg), VWR (Darmstadt) sowie Sarstedt (Nümbrecht). Spezielle Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Material	Hersteller
Einbettkassetten	Kabe Labortechnik, Nümbrecht
Glaskapillaren	Brand, Wertheim
MACS <i>Separation Columns</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Nahtmaterial Mersilene 2-0	Ethicon, Norderstedt
Objektträger SuperFrost/Plus	Karl Hecht KG, Sondheim
Vasofix Venenverweilkanüle 22G	B. Braun, Melsungen

Tabelle 2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Reagenz	Hersteller
Agarose SeaKem LE	Lonza, Köln
Ammoniumchlorid	TH Geyer, Renningen
Collagenase aus <i>Clostridium histolyticum</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	TH Geyer, Renningen
DEPC-behandeltes Wasser	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt
Dextran-Sodium-Sulfat (36000-50000 Da)	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Dinatriumhydrogenphosphat	TH Geyer, Renningen
DMEM (1x) + <i>GlutaMAX</i> - Medium	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
DNAse I	Roche Diagnostics, Mannheim
Eosin	Carl Roth, Karlsruhe
Eukitt Eindeckmedium	O. Kindler, Freiburg
Ethanol 96 Vol.%, vergällt	Walter CMP, Kiel
Ethanol 96 Vol.%	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure	TH Geyer, Renningen
Fetales Kälberserum	PAA Laboratories, Cölbe
Formaldehydlösung, 36,5%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hämatoxylin	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> (IMDM)	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
Ionomycin Calciumsalz	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Isopropanol	TH Geyer, Renningen
Kaliumchlorid	TH Geyer, Renningen

Reagenz	Hersteller
Kaliumdihydrogenphosphat	TH Geyer, Renningen
Kaliumhydrogencarbonat	TH Geyer, Renningen
Ketamin Gräub	Albrecht, Aulendorf
Lympholyte-M	Cedarlane, Burlington (Ontario), Kanada
Methanol	Avantor Materials, Deventer, Niederlande
Monensin-Lösung (1000x)	Biologend, London, England
Natriumacetat	Avantor Materials, Deventer, Niederlande
Natriumchlorid	TH Geyer, Renningen
Natriumhydroxid	TH Geyer, Renningen
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
PenStrep (Penicillin + Streptomycin)	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
Percoll	GE Healthcare Europe, Freiburg
Phorbol-12-myristate-13-acetate	Merck, Darmstadt
Phosphatgepufferte Salzlösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure, rauchend	TH Geyer, Renningen
Streptavidin <i>MicroBeads</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Trizol Reagenz	Life Technologies, Darmstadt
Trypanblau 0,4 %-Lösung	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
Xylazin (Rompun) 2% Injektionslösung	Bayer Vital, Leverkusen
Xylol	O. Kindler, Freiburg

Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Spezifität	Klon	Fluorochrom	Hersteller
CD3	17A2	Alexa Fluor 700	Biolegend, London, England
CD3	17A2	PE	Biolegend, London, England
CD3	17A2	PE-Cy7	Biolegend, London, England
CD4	GK1.5	APC-Cy7	Biolegend, London, England
CD4	RM4-5	Pacific blue	Biolegend, London, England
CD4	RM4-5	Brilliant violet 570	Biolegend, London, England
CD11B	M1/70	APC-Cy7	Biolegend, London, England
CD11B	M1/70	APC	Biolegend, London, England
CD11C	N418	PeCy7	Biolegend, London, England
CD11C	HL3	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD45.1	A20	Pacific blue	Biolegend, London, England
CD45.1	A20	Alexa Fluor 700	Biolegend, London, England
CD45.2	104	APC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD45.2	104	FITC	Biolegend, London, England
CD45.2	104	PE-Cy7	Biolegend, London, England
LY6C	HK1.4	PE	Biolegend, London, England
LY6G	1A8	Brilliant Violet 421	Biolegend, London, England
NK1.1	PK136	Brilliant Violet 421	Becton Dickinson, Heidelberg
NK1.1	PK136	PE-Cy7	Biolegend, London, England
IFN- γ	XMG1.2	APC	Becton Dickinson, Heidelberg
IFN- γ	XMG1.2	PE	Biolegend, London, Engla
IL-17A	TC11-18H10.1	Alexa Fluor 488	Biolegend, London, England
IL-17A	TC11-18H10.1	Alexa Fluor 647	Biolegend, London, England
Foxp3	NRRF-30	PE	eBioscience, Frankfurt a. M.
TCR- $\gamma\delta$	GL3	Brilliant Violet 421	Biolegend, London, England
TCR- β	H57-597	Brilliant Violet 421	Biolegend, London, England

Tabelle 2.4: Verwendete FACS-Antikörper

Ziel-Gen	Assay ID
<i>Il6</i>	Mm0044619_m1
<i>Il17a</i>	Mm00439618_m1
<i>Il22</i>	Mm00444241_m1
<i>Il22ra2</i>	Mm00617572_m1
<i>Il23</i>	Mm01160011_g1
<i>Hprt</i>	Mm01545399_m1
<i>Tnfa</i>	Mm00443260_g1
<i>Ifnγ</i>	Mm01168134_m1
<i>Tgfβ1</i>	Mm01178820_m1
<i>Acta2</i>	Mm00725412_s1
<i>Col1a1</i>	Mm00801666_g1
<i>Timp</i>	Mm00441818_m1
<i>Mmp8</i>	Mm00439509_m1
<i>Cxcl10</i>	Mm00445235_m1
<i>Ccl2</i>	Mm00441242_m1
<i>Nos2</i>	Mm00440502_m1
<i>Arg1</i>	Mm00475988_m1

Tabelle 2.5: Verwendete TaqMan-Sonden, *Applied Biosystems*, Foster City, USA

Zytokin	Hersteller
IL-2	PeproTech, Hamburg
IL-6	Biologend, London, England
IL-12	PeproTech, Hamburg
IL-23	Biologend, London, England
IL-1 β	R&D Systems, Minneapolis, USA
TNF- β 1	R&D Systems, Minneapolis, USA

Tabelle 2.6: Verwendete Zytokine für die Zellkultur

Kit	Hersteller
<i>High capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	Life Technologies, Darmstadt
<i>Dynabeads mRNA DIRECT</i>	Life Technologies, Darmstadt
<i>UMD-Universal</i>	Molzym, Bremen

Tabelle 2.7: Verwendete gebrauchsfertige Kits

2.1 Puffer und Medien

10x ACK-Puffer

NH₄CL 150 mM
KHCO₃ 10 mM
EDTA 1 μ M
in ddH₂O

FACS-Puffer

2,5% FCS
0,03% NaN₃
in 1x PBS

4%ige Formaldehyd-Lösung

40 g PFA
in 1 l ddH₂O
pH=7,4 (eingestellt mit HCl)

MACS-Puffer

10% FCS
2 mM EDTA
in 1x PBS, sterilfiltriert

Medium komplett

10% FCS
1% PenStrep
in DMEM GlutaMAX

Medium für Verdau

1% FCS
1% PenStrep
10 U/ml DNase
1 mg/ml Collagenase
in DMEM GlutaMAX

Narkose

12 mg Ketamin

1,6 mg Xylazin

in 1 ml 0,9% NaCl-Lösung

10x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

80 g NaCl

2 g KCl

11,5 g Na₂HPO₄

2 g KH₂PO₄

in 1 l ddH₂O

2.2 Versuchstiere

Die verwendeten Tiere wurden in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) gezüchtet. Die Kontrolltiere entstammen der Linie C57Bl/6, alle verwendeten transgenen Tiere wurden mindestens über 10 Generationen auf einen C57Bl/6-Hintergrund zurückgekreuzt.

Folgende transgene und Knockout-Linien wurden verwendet:

Linie	Beschreibung
C57Bl/6	Wildtyp beziehungsweise Hintergrundlinie
<i>Mdr2</i> ^{-/-}	homozygote Deletion des <i>Multi drug resistance gene 2</i>
<i>Rag1</i> ^{-/-}	homozygote Deletion des <i>Recombination activation gene 1</i> , Fehlen reifer B- und T-Zellen; CD45.1 ⁺
<i>Triple-reporter</i>	Koexpression von Fluoreszenzfarbstoffen mit Foxp3, IL-17A, IFN- γ (<i>Foxp3</i> -mRFP-KI; <i>Il17a</i> -eGFP-KI, <i>Ifnγ</i> -FP635-KI); CD45.2 ⁺

Tabelle 2.8: Verwendete Mauslinien. KI: Knock-in

Die *Mdr2*^{-/-}-Tiere wurden freundlicherweise von Prof. E. Galun, Goldyne Savad Institute of Gene Therapy, Israel, zur Verfügung gestellt und ebenfalls in der Versuchstierhaltung des UKE gezüchtet.

Sämtliche Tiere wurden unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen (SPF) in einzelbelüfteten Käfigen gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Standardfutter. Die tierexperimentellen Arbeiten wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung 12/37 und G13/035 durchgeführt. Für die von mir selbst durchgeführten Eingriffe lag eine Ausnahmegenehmigung nach §9 Abs.1 Satz 4 TierSchG vor.

Während der Versuche wurden die Tiere entsprechend des Tierversuchsantrages täglich auf Anzeichen von Belastung geprüft und regelmäßig gewogen. Der Gewichtsverlust wurde prozentual zum Ausgangsgewicht bei Versuchsbeginn berechnet. Tiere, die mehr als 20% ihres Ausgangsgewichts verloren, einen endoskopischen Kolitis-Score über 12 oder Zeichen massiver Belastung zeigten, wurden aus dem Versuch genommen und umgehend durch cervikale Dislokation nach CO₂-Narkose getötet.

2.3 Kolitis-Induktion

DSS-Kolitis

Die orale Gabe von DSS zerstört die *Tight Junctions* des Darmepithels und induziert eine primäre Barrierestörung. Durch die Aktivierung des Immunsystems resultiert daraus eine Entzündungsreaktion, welche dem klinischen Bild der UC ähnelt [117].

Zur Induktion einer akuten DSS-Kolitis erhielten die Mäuse über 7 Tage 3% DSS-Lösung als Trinkwasser *ad libitum*, anschließend wurde bis zum Versuchsende autoklaviertes Leitungswasser gegeben.

Die chronische DSS-Kolitis wurde durch Gabe von 2,5%- beziehungsweise 3% DSS-Lösung für zwei Zyklen à 5 Tagen und einem dritten Zyklus à 7 Tagen induziert. Zwischen den Zyklen wurde für 16 Tage autoklaviertes Leitungswasser gegeben. Die alters- und geschlechtsangeglichenen Kontrolltiere erhielten nur autoklaviertes Leitungswasser. Nach jedem DSS-Zyklus wurde eine Endoskopie unter Isoflurannarkose durchgeführt (siehe Kapitel 2.4).

Induktion einer Kolitis durch T-Zell-Transfer

Durch den Transfer von naiven T-Zellen beziehungsweise T-Gedächtniszellen in immundefiziente *Rag1*^{-/-}-Mäuse wird eine Kolitis induziert [124]. Analog dazu kann eine Kolitis auch durch den Transfer von bereits *in vitro* differenzierten Th1- beziehungsweise Th17-Zellen hervorgerufen werden [125]. Die verwendeten naiven T-Zellen stammten aus Dreifach-Reporter-mäusen, welche neben dem jeweiligen Gen-Produkt von Interesse unter demselben Promoter einen Fluoreszenz-Farbstoff exprimieren (siehe Tabelle 2.8), der in der Durchflusszytometrie detektiert werden kann. Dies ermöglicht die Sortierung der vitalen Zellen ohne die für eine intrazelluläre Zytokin-Färbung notwendige Permeabilisierung der Zellmembran. Die Differenzierung der transferierten Zellen von denen des Empfängers erfolgte über das CD45-System: Die Donor-Mäuse wiesen zusätzlich eine kongene Expression von CD45.2 auf, während die *Rag1*^{-/-}-Empfänger CD45.1 exprimierten.

Isolation naiver T-Lymphozyten und antigenpräsentierender Zellen

Bei der magnetischen Zellseparation (*Magnetic Activated Cell Sorting*, MACS) wird die Expression spezifischer Oberflächenmarker genutzt, um Zellpopulationen zu isolieren. Dazu werden die Zellen mit Antikörpern markiert, welche an magnetische Partikel, sogenannte *Microbeads*, gekoppelt sind. Anschließend wird die Zellsuspension über eine Trennsäule gegeben, die sich in einem starken magnetischem Feld befindet und nur die Antikörpermarkierten Zellen zurückhält. Diese können eluiert werden, wenn die Säule aus dem Magnetfeld entfernt wird [129].

Zunächst wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt: Die entnommenen Lymphknoten und Milzen wurden von anhängendem Fett befreit und mit einem Spritzenstempel durch eine steriles 100 µm-Zellsieb gedrückt. Das Zellsieb wurde mit 20 ml PBS-1%FCS gespült und die Suspension abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 4 °C).

Dann erfolgte eine Depletion der regulatorischen T-Zellen beziehungsweise T-Gedächtniszellen, welche als Oberflächenmarker CD25 beziehungsweise CD44 exprimieren. Hierzu wurde das Zellpellet in 250 µl MACS-Puffer pro Donor-Maus mit 1:400 biotiniliertem Anti-CD25-Antikörper und Anti-CD44-Antikörper aufgenommen und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 250 µl MACS-Puffer pro Maus mit 1:25 Streptavidin-gekoppelten *Microbeads* versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Suspension durch ein 40 µm-Zellsieb auf die zuvor mit 3 ml MACS-Puffer äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen, um alle nicht markierten Zellen auszuspülen. Der Durchfluss wurde aufgefangen und die darin enthaltenen Zellen abzentrifugiert.

Nun erfolgte die Positiv-Selektion der naiven T-Zellen: Das verbleibende Zellpellet wurde in 250 µl MACS-Puffer pro Maus mit 1:10 Anti-CD4-*Microbeads* resuspendiert und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde über eine frische Säule gegeben. Der Durchfluss wurde zur weiteren Isolation von APC aufgefangen. Anschließend wurden die in der Säule verbleibenden naiven T-Zellen (CD44⁻CD25⁻CD4⁺) eluiert, abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis verwahrt.

Der APC-haltige Durchfluss wurde zentrifugiert und mittels Negativ-Selektion analog zu der Selektion von CD44⁻CD25⁻CD4⁺-Zellen von CD3⁺-Zellen befreit. Anschließend wurde eine Erythrozyten-Lyse, wie in 2.6 beschrieben, durchgeführt. Um ein übermäßiges Wachstum der APC in der Zellkultur zu vermeiden, wurden diese mit einer Gesamtdosis von 30 Gy bestrahlt.

In vitro Differenzierung von T-Zellen

Die isolierten naiven T-Zellen wurden in getrennten Kulturen zu Th1- Zellen (Produktion von IFN- γ) beziehungsweise Th17- Zellen (Produktion von IL-17) differenziert. Dazu wurden $2 \cdot 10^5$ naive T-Zellen pro Well unter entsprechender Stimulation, wie in Tabelle 2.9a und 2.9b aufgeführt, in kompletten IMDM für 4 Tage bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter 5% CO₂-Athmosphäre inkubiert.

Reagenz	Konzentration
CD3-Antikörper	3 μ g/ml
CD28-Antikörper	1 μ g/ml
IL-4-Antikörper	10 μ g/ml
IFN- γ -Antikörper	10 μ g/ml
IL-6	10 ng/ml
IL-23	20 ng/ml
IL-1 β	10 ng/ml
TGF- β 1	0,5 ng/ml
APC : T-Zellen	4:1

(a) Stimulation Th17- Zellen

Reagenz	Konzentration
CD3-Antikörper	coated
CD28-Antikörper	10 μ g/ml
IL-4-Antikörper	1 μ g/ml
IL-2	10 U/ml
IL-12	10 ng/ml

(b) Stimulation Th1- Zellen

Tabelle 2.9: Stimulation zur Differenzierung der naiven T-Zellen. *Coated:* 50 μ l *Anti-CD3-Antikörper* (10 μ g/ml) wurden für 4h bei 37 °C in die Wells gegeben, *ungebundene Antikörper* wurden abgenommen.

Nach 4 Tagen Stimulation wurden die Zellen geerntet und die Th1- sowie Th17-Zellen separat gepoolt. Die Zellen wurden aus der 96-Well-Platte entnommen, zentrifugiert und anschließend analog zu Kapitel 2.7 mit extrazellulärer Antikörpern gegen CD3 und CD4 markiert. Anschließend erfolgte eine Dichtezentrifugation mittels Lympholyte-M, um tote Zellen sowie APCs zu entfernen. Dazu wurde die Zellsuspension vorsichtig über 2 ml Lympholyte-M-Lösung geschichtet und bei 22 °C für 20 min bei 1500 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Interphase, welche die Leukozyten enthält, abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Die Zellen wurden einmal mit 20 ml PBS-1%FCS gewaschen, abzentrifugiert und in 1 ml PBS-1%FCS lichtgeschützt auf Eis bis zur Sortierung verwahrt.

Sortierung und Transfer

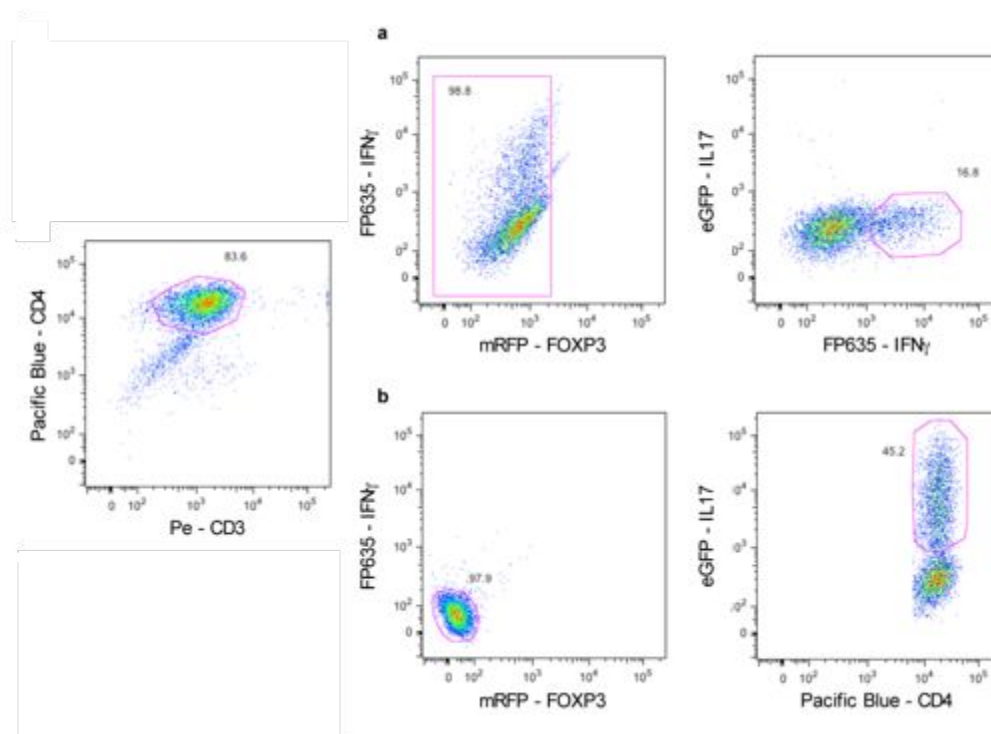


Abbildung 2.1: Sorting-Strategie der *in vitro* differenzierten T-Zellen. Das vorhergehende Gating entsprach dem in Abb. 2.2 dargestelltem Gating nach FSC und SSC. Von den $CD4^+$ -T-Zellen wurden die regulatorischen T-Zellen abgetrennt und anschließend Zellen mit der durch den entsprechenden Reporter angezeigten Zytokinproduktion ausgewählt. a) Gating für Th1-Zellen b) Gating für Th17-Zellen.

Die Zellen wurden mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACS Aria III) sortiert. Abbildung 2.1 zeigt die dazu verwendete Sorting-Strategie.

Im Anschluss wurden die Zellen zweifach mit 5 ml PBS gewaschen, gezählt (siehe Kapitel 2.6) und auf eine Konzentration von $3,75 \cdot 10^5$ /ml eingestellt. Pro Versuchstier wurden $2,5 \cdot 10^4$ Th1- oder Th17-Zellen intraperitoneal gespritzt. Den Kontrolltieren wurde 200 μ l PBS injiziert. Die Mäuse wurden täglich auf Anzeichen von Belastung geprüft und wöchentlich gewogen. Ab der dritten Woche wurden die Mäuse einmal wöchentlich unter Isoflurannarkose endoskopiert, um die Kolitis-Schwere zu evaluieren (siehe Kapitel 2.4).

2.4 Endoskopie

2 Tage nach Ende der DSS-Behandlung beziehungsweise wöchentlich ab der 3. Woche nach Zelltransfer wurden die Versuchstiere unter Isoflurannarkose mit Hilfe eines Coloview-Systems (Karl Storz) endoskopiert, um die Entwicklung der Kolitis während der Experimente zu überwachen. Dazu wurden die Parameter Stuhlbeschaffenheit, Vorhandensein

von Fibrin, Ulzerationen, Granularität sowie Dicke der Mukosa mit 0 bis 3 Punkten bewertet (0= normal, 1=mild, 2= moderat, 3= schwer), es ergab sich ein Score von 0-15 Punkten. Der Untersucher war verblindet bezüglich der Gruppenzugehörigkeit.

2.5 Blut- und Organentnahme

Durch i.p.-Injektion von Narkoselösung (10 µl/g Körpergewicht) wurden die Tiere tief betäubt und anschließend durch cervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde das Fell mit 70% Ethanol-Lösung desinfiziert. Für Versuche mit mikrobieller Analyse wurden alle weiteren Arbeiten unter einer Sicherheitswerkbank und sterilen Kautelen durchgeführt. Die Bauchhöhle wurde mit einer Schere eröffnet und der Darm seitlich weggeklappt. Die Pfortader wurde mit einem 22G-Venenverweilkatheter punktiert und der Katheter mit chirurgischem Faden fixiert. Das zurücklaufende Pfortaderblut wurde in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, zusätzlich erfolgte eine separate Blutentnahme aus der Vena cava für die Bestimmung der Leberenzyme im Serum. Nach den separaten Blutentnahmen wurde die Leber mit kaltem PBS durch den einliegenden Katheter perfundiert, um verbleibendes Blut aus dem Gewebe zu entfernen. Anschließend wurde die Leber entnommen und anhängendes Restgewebe entfernt. Der rechte obere Leberlappen wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Extraktion bei -80°C gelagert. Der linke obere Leberlappen wurde zur anschließenden histologischen Untersuchung in 4%ige gepufferte Formaldehydlösung überführt. Der rechte untere Leberlappen wurde für die mikrobiologischen Untersuchungen verwendet. Das verbleibende Lebergewebe wurde gewogen und bis zur Zellisolation in DMEM auf Eis gelagert.

Der Dickdarm wurde unterhalb des Zäkums und proximal der Analmanschette durchtrennt, anhängendes Fett entfernt und die Länge bestimmt. Anschließend wurden 2 je 1 cm lange Stücke abgetrennt. Das distale Stück wurde für die anschließende histologische Untersuchung in 4%ige gepufferte Formalinlösung überführt. Das darauffolgende Stück wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Extraktion bei -80°C gelagert. Der verbleibende Teil wurde längs aufgeschnitten, zweifach in kaltem 1x PBS gewaschen und bis zur Zellisolation in einem Röhrchen mit 10 ml komplettem Medium auf Eis verwahrt.

Zur *in vitro* Differenzierung von T-Zellen (siehe Kapitel 2.3) wurden lediglich die Milz sowie cervicale, axilläre, poplitäre und intestinale Lymphknoten entnommen und in komplettem Medium auf Eis verwahrt.

2.6 Zellisolation

Darmgewebe

Pro Darm in 10 ml Medium wurden 20 μ l Ethylendiamintetraacetat (EDTA; 0.5 M, pH 8) zugesetzt, danach erfolgte eine Inkubation im Wasserbad unter Schütteln bei 37 °C für 30 Minuten. Durch das Schütteln lassen sich die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) aus dem Darmepithel lösen. Anschließend wurde der Darm in eine Petrischale überführt, das verbleibende Medium mit den IEL mit PBS-1%FCS-Lösung auf 15 ml aufgefüllt und auf Eis verwahrt. Um die Lamina Propria Lymphozyten (LPL) zu isolieren, muss das Gewebe einem Verdau unterzogen werden: Hierzu wurde das verbliebene Gewebe zunächst mit einer Schere zerkleinert und mit 6 ml Verdau-Medium bei 37 °C für 45 Minuten im Wasserbad unter Schütteln inkubiert.

Nach dem Verdau wurde die Suspension durch ein 230 μ m Metallsieb in einen 50 ml Röhrchen überführt, noch vorhandene Gewebestücke wurden mit einem Glaspistill zerrieben und das Sieb mit PBS-1%FCS nachgespült. Anschließend wurden sowohl die LPL- als auch die IEL- Suspension abzentrifugiert (1600 rpm, 10 Min., 4 °C) und der Überstand verworfen. Um die Lymphozyten von den anderen Zellen zu trennen, erfolgte eine Dichtegradienten-Zentrifugation. Die Zellpellets der IEL und LPL wurden zusammen in 4 ml 40%ige Percoll-Lösung aufgenommen. 4 ml 90%iges Percoll wurden mit der Zellsuspension überschichtet. Die Dichtezentrifugation erfolgte mit 400 rcf bei 20 °C für 20 Minuten ohne Bremse. Die Interphase wurde abgenommen, mit 50 ml PBS-1%FCS gewaschen und abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 1 ml PBS-1%FCS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 2.6).

Lebergewebe

Das perfundierte Lebergewebe wurde durch ein 230 μ m Metallsieb gerieben, in 50 ml PBS-1%FCS aufgenommen und bei 1500 rpm und 4 °C 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 ml 40%ige Percoll-Lösung aufgenommen. 4 ml 90%iges Percoll wurden mit der Zellsuspension überschichtet und mit 400 rcf bei 20 °C für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase wurde abgenommen, mit 50 ml PBS-1%FCS gewaschen und abzentrifugiert (1500 rpm, 5 Min., 4 °C). Nach Lyse der Erythrozyten (siehe Kapitel 2.6) wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (1500 rpm, 5 Min., 4 °C), in 3 ml PBS-1%FCS aufgenommen und ein Aliquot zur Zellzahlbestimmung (siehe Kapitel 2.6) abgenommen.

Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer. 50 μ l Zellsuspension wurden 1:10 mit Trypanblau versetzt und 10 μ l in die Kammer überführt. Trypanblau akkumuliert in toten Zellen, welche so beim Zählen ausgeschlossen werden konnten. Zwei Großquadrate wurden ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Die Zellzahl pro ml wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen pro Großquadrat} \cdot 10 (\text{Verdünnungsfaktor}) \cdot 10^4 (\text{Kammerfaktor})$$

Erythrozyten-Lyse

Erythrozyten können Antikörper unspezifisch binden und dadurch mit FACS-Färbungen interferieren. Zur Lyse der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 1 ml Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat-Puffer (ACK-Puffer) resuspendiert. Nach 1 min wurde die Reaktion durch Verdünnung mit 20 ml PBS-1%FCS gestoppt und die Zellsuspension bei 1500 rpm und 4 °C 5 Minuten zentrifugiert.

2.7 Durchflusszytometrie

Um die verschiedenen Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenproteine beziehungsweise Zytokinproduktion zu differenzieren, wurden die Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse.

Färbung extrazellulärer Oberflächenmarker

Die Zellen wurden in 5 ml-Röhrchen überführt, mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern und FC-Rezeptoren zu blockieren, wurden die Zellen in 50 μ l FACS-Puffer mit 0,5 μ l blockierendem Antikörper für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 50 μ l des Mastermix mit den spezifischen Antikörpern (je nach Zielprotein in einer Endverdünnung von 1:50 bis 1:600) folgte eine Inkubation von 20 min bei 4 °C im Dunkeln. Die Proben wurden mit 1 ml-FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden entweder eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt oder die Zellen wurden in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Analyse lichtgeschützt auf Eis verwahrt.

Intrazelluläre Zytokinfärbung

Um die Produktion der intrazellulären Zytokine IFN- γ und IL-17 sowie des Transkriptionsfaktors Foxp3 nachzuweisen, wurde eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt. Da eine Zytokinproduktion erst nach Aktivierung der T-Zellen stattfindet, wurden die

Zellen zunächst restimuliert (siehe Kapitel 2.7). Nach extrazellulärer Färbung (siehe Kapitel 2.7) wurden die Zellen in 100 μ l Fixations-Puffer für 20 min bei Raumtemperatur fixiert und mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μ l Perm-Puffer für 4 min bei Raumtemperatur permeabilisiert und erneut mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Die intrazelluläre Färbung erfolgte über Nacht in 100 μ l FACS-Puffer und den jeweiligen Antikörpern in einem Verhältnis von 1:75-1:100. Die Zellen wurden zweifach mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen, in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert und vor der Analyse durch ein 40 μ m-Zellsieb gefiltert.

In vitro Stimulation von T-Zellen

Um die Zytokinexpression der T-Zellen zu analysieren, wurden diese vor der Zytokinfärbung (siehe Kapitel 2.7) unspezifisch mit Phorbol-12-myristat-13-acetat und Ionomycin stimuliert. Die isolierten Zellen wurden einmal mit 1 ml PBS-1%FCS gewaschen und in 1 ml komplettem Medium mit 50 ng/ml PMA, 1 mmol/l Ionomycin und 2 μ mol/l Moensin für 3,5 h bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen.

Analyse-Strategien für die Durchflusszytometrie

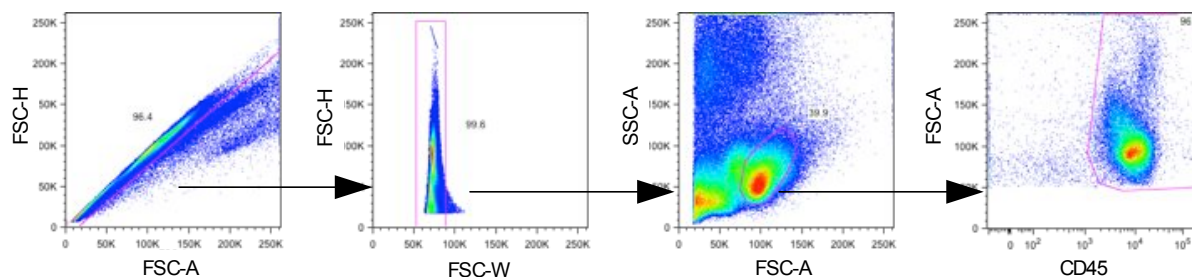


Abbildung 2.2: Beginn der Analyse-Strategie für alle isolierten Zellen. Um nur Einzelzellen in die Analyse einzuschließen, erfolgte zunächst der Ausschluss von Dupletten, indem nur Zellen mit linearem FSC-A/FSC-H -Verhältnis ausgewählt wurden. Anschließend wurden die Lymphozytenpopulation mittels Größe und Granularität abgegrenzt und gleichzeitig Zelltrümmer ausgeschlossen. In die weitere Analyse gingen jeweils nur Immunzellen mit einer Produktion von CD45.1 beziehungsweise CD45.2 ein.

Die Leber enthält neben verschiedenen T-Zellen vor allem eine Vielzahl an Immunzellen des angeborenen Immunsystems, darunter Makrophagen, DC sowie natürliche Killerzellen (NK) und NKT-Zellen [130, 131, 132]. Um eine größtmögliche Anzahl an Zelltypen zu identifizieren, wurden die aus der Leber isolierten Zellen geteilt: Ein Teil der Zellen wurde restimuliert und anschließend intra- sowie extrazellulär gefärbt, die Analysestrategie ist in Abb. 2.3 gezeigt. Der andere Teil der Zellen wurde extrazellulär gefärbt und nach dem in

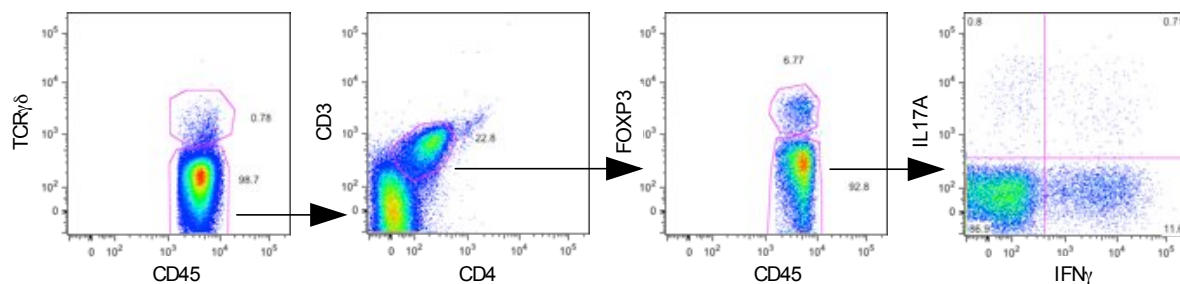


Abbildung 2.3: Analyse-Strategie für intestinale und hepatische T-Zellen. *Das vorhergehende Gating entsprach dem in Abb. 2.2 dargestellten Gating nach FSC und SSC. Diese Analyse kam - angepasst an die jeweilige Färbung - für alle T-Zellen zur Anwendung.*

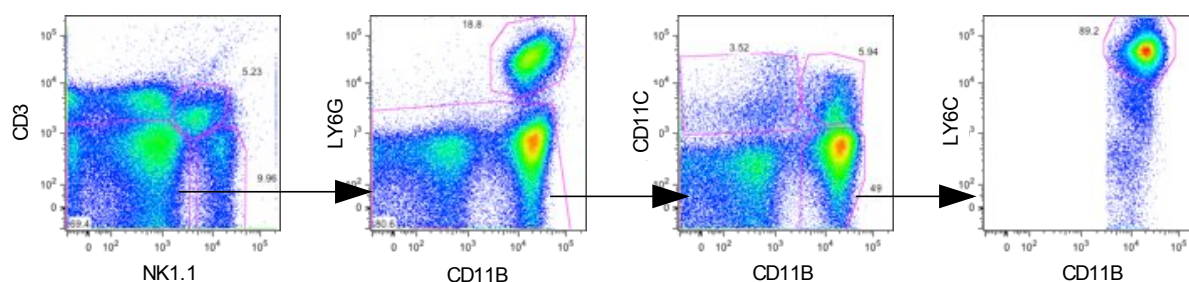


Abbildung 2.4: Analyse-Strategie für hepatische Zellen des angeborenen Immunsystems. *Das vorhergehende Gating entsprach dem in Abb. 2.2 dargestellten Gating nach FSC und SSC. Diese Analyse kam - angepasst an die jeweilige Färbung - für alle Versuche zur Anwendung.*

Abb.2.4 gezeigten Schema analysiert. Dabei wurde, um die insgesamt erfassten Zellgruppen zu erhöhen, auf eine feine Subtypisierung beispielsweise der DC verzichtet. Aus allen $CD45^+$ -Zellen der restimulierten Proben wurden zunächst die $\gamma\delta$ -T-Zellen abgetrennt, anschließend wurden aus der $CD3^+CD4^+$ -Population die regulatorischen T-Zellen anhand ihrer Foxp3-Produktion identifiziert. Die verbleibenden $CD3^+CD4^+$ -T-Zellen wurden entsprechend der Zytokinproduktion von IFN- γ und IL17-A in Th1-, T17- sowie doppelpositive Th1+Th17-Zellen unterteilt (siehe Kapitel 2.3).

Für die Zellen des angeborenen Immunsystems wurde die in Abb. 2.4 abgebildete Analyse-Strategie verwendet. Aus allen $CD45^+$ -Zellen wurden $NK1.1^-$ sowie $CD3^+$ -Zellen aussortiert und $NK1.1^+CD3^-$ -Zellen den natürlichen Killerzellen, beziehungsweise $NK1.1^+CD3^+$ -Zellen den natürlichen Killer-T-Zellen zugeordnet [133, 134]. Anschließend wurden die $CD11B^+LY6G^+$ -Zellen als neutrophile Granulozyten identifiziert [135].

Zur Differenzierung von Monozyten, DC und Makrophagen kamen CD11B, CD11C sowie LY6C als Marker zum Einsatz, wobei mit dieser Antigen-Kombination aufgrund der Komplexität dieser Zellgruppen keine detaillierte Unterteilung erfolgen kann. Zusätzlich bestehen in der aktuellen Literatur variable Bezeichnungen für diese Zellgruppen. Die verbleibenden Zellen wurden anhand ihrer Expression von CD11B und CD11C auf-

geteilt. Dabei beinhaltet die Gruppe der CD11B⁻CD11⁺-Zellen am ehesten klassische dendritische Zellen (cDC) und die CD11B⁺CD11C⁺-Population plasmazytoide dendritische Zellen (pDC). Zu beachten bleibt, dass CD11C nicht exklusiv auf DC exprimiert wird und diese Population potentiell auch Makrophagen enthält [136]. Zudem ist die Expression von CD11B, CD11C und LY6C innerhalb der Subgruppen variabel, weswegen die identifizierten Gruppen verschiedene Zelltypen beinhalten können [137]. Aus den CD11B⁺CD11c⁻-Zellen wurden mittels LY6C die inflammatorischen Monozyten beziehungsweise Monozyten-abgeleiteten-Zellen identifiziert [138].

Die Auswertung der Experimente erfolgte mit FlowJo 8.8.6. Wurde ein Versuch in mehreren Teilversuchen durchgeführt, wurden die Gating-Schritte jeweils analog angewendet.

2.8 Histologie

Herstellung der Schnitte

Die Organe wurden entnommen und für 24 h in 4%iger-Formalin-Lösung fixiert. Danach wurden die Organe für 1 h in Leitungswasser gewässert. Anschließend erfolgte eine aufsteigende Alkoholreihe mit 20%iger-, 40%iger- und 70%iger-Isopropanol-Lösung für jeweils 1 h. Die Einbettung in Paraffin wurde durch das Institut für Pathologie des UKE durchgeführt. Am Mikrotom wurden 4 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Superfrost-Objektträger aufgezogen.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) dient als Übersichtsfärbung für eine orientierende histologische Beurteilung. Zellkerne werden blau angefärbt, Muskel- und Bindegewebe stellen sich rosa dar [139]. Die Färbung wurde mit einem Tissue-Tek-Prisma-Färbeautomaten im Institut für Pathologie des Univeristätsklinikum Eppendorf nach dem in Tabelle 2.10 aufgeführten Schema durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte mit Hilfe eines Tissue-Tek-Film-Automaten eingedeckt.

Histopathologische Beurteilung

Um die Entzündungsaktivität von Darm- und Lebergewebe zu quantifizieren, wurden die HE-gefärbten Schnitte von einer erfahrenen Pathologin verblindet beurteilt. Das Kolongewebe wurde mit einem Score von 0-3 bezüglich der Infiltration inflammatorischer Zellen sowie dem Ausmaß der Gewebeschädigung bewertet. Ein Gesamt-Score von 0 entspricht keiner Schädigung, während bei einem Score von 6 eine massive Kolitis vorliegt [140]. Für die Bewertung der Leberentzündung wurde der modifizierte histologische Aktivitätsindex (mHAI) verwendet: Beurteilt wird hierbei das Vorhandensein von Interface Hepatitis

Schritt	Reagenz	Zeit (Minuten)
1	Xylol	1:30
2	Xylol	1:30
3	100% Ethanol	1:00
4	96% Ethanol	1:00
5	80% Ethanol	1:00
6	fließendes Leitungswasser	0:30
7	Hämalaun	0:20
8	fließendes Leitungswasser	5:00
9	HCL-Alkohol 0,5%	2:00
10	fließendes Leitungswasser	1:00
11	80% Ethanol	1:00
12	Eosin 2%	1:00
13	100% Ethanol	1:00
14	100% Ethanol	1:00
15	Xylol	1:00

Tabelle 2.10: Färbeschema HE-Färbung

(0-4), konfluenter Nekrosen (0-6), Einzelzelluntergängen (0-4) sowie das Ausmaß der portalen Entzündung (0-4). Der Grad der Fibrose wurde in Stadien von 0-6 eingeteilt, wobei 0 dem Vorliegen einer gesunden Leber und 6 einer kompletten Zirrhose entspricht.[141]

2.9 Klinische Chemie

Das aus der Vena cava inferior gewonnene Vollblut wurde 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert und das Serum vorsichtig vom Koagel abgenommen. Um ein ausreichendes Volumen zu erreichen, wurden die Proben 1:5 mit 1xPBS verdünnt. Im Institut für Klinische Chemie des UKE wurden die Aspartat-Aminotransferase (AST) und die Alanin-Aminotransferase (ALT) sowie die Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) bestimmt. Die Analysen wurden mit einem Dimension Vista 1500 System (Siemens) durchgeführt.

2.10 Nachweis bakterieller Translokation

Die mikrobiologischen Analysen wurden durch das Institut für Mikrobiologie des UKE durchgeführt. Steril entnommenes Lebergewebe wurde durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt und mit 3 ml 1xPBS zu einer Suspension vermischt. Um eine möglichst hohe Sensitivität

zu erreichen, wurde für jede Probe aus der hergestellten Suspension eine aerobe sowie anaerobe Kultur angelegt sowie eine Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) auf bakterielle 16S-rDNA durchgeführt.

Kultureller Nachweis

Pro Versuchstier wurde ein Paar Blutkulturflaschen (aerob und anaerob) mit 1 ml der Gewebe-Suspension beimpft und für 5 Tage in einem BACTEC-System (BD) bebrütet. Bei einem positivem Bakteriennachweis erfolgte eine massenspektroskopische Untersuchung zur Identifizierung der Bakterienart.

Nachweis bakterieller 16S-rDNA

Um mit konventioneller Kultivierung nicht anzüchtbare Bakterien zu erfassen, wurde das UMD-Universal-Kit (Molzym) entsprechend der Herstelleranweisung verwendet. Hierbei wird zunächst potenziell pathogene DNA aufgereinigt und anschließend eine universelle 16S-rDNA-PCR durchgeführt. Eine PCR-Reaktion wurde als positiv gewertet, wenn ein Signal vor dem 35. Zyklus nachweisbar war. In diesem Fall wurde das Amplifikat sequenziert und mit der online verfügbaren SepsitestTM-BLAST- Datenbank (<http://www.sepsitest-blast.de/de/index.html>) abgeglichen.

2.11 RNA-Analyse

Isolation von Gesamt-RNA

Die Ribonukleinsäure (*ribonuclein acid*, RNA) wurde durch saure Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Als gebrauchsfertige phenol- und guanidiniumthiocyanathaltige Lösung wurde dazu Trizol[®] verwendet.

Die zuvor schockgefrorenen Gewebeproben wurden in 1 ml Trizol[®] mit Hilfe eines motorbetriebenen Pistills homogenisiert. 200 µl Chloroform wurde zugegeben und die Probe für 30 s gründlich durchmischt. Nach 3-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die wässrige Phase durch Zentrifugation (12000 g, 10 min, 4 °C) abgetrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit 500 µl Isopropanol vermischt und für mindestens 2 h bei -20 °C inkubiert, um die RNA zu präzipitieren. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (12000 g, 30 min, 4 °C), der Überstand abgenommen und das verbleibende RNA-Pellet in 700 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur 10 min getrocknet. Abhängig von der Pelletgröße wurden 50 µl bis 100 µl Diethylpyrocarbonat-behandeltes Wasser (DEPC-H₂O) hinzugefügt und das Pellet für 5 min bei 55 °C im Thermocycler

resuspendiert. Der RNA-Gehalt sowie die Reinheit wurden durch Messung der Absorption mit einem NanoDrop 2000 Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260/280 nm bestimmt.

Isolation von Messenger-RNA

Nach oraler Gabe von DSS wird dieses resorbiert und ist nicht nur im Darm, sondern auch in weiteren Organen wie Leber, Milz und Lymphknoten nachweisbar [123].

Da DSS die reverse Transkriptase sowie die Taq-Polymerase inhibiert, kann eine qPCR-Analyse erst nach einer weiteren Aufreinigung erfolgen [123, 142]. Dazu wurde aus der Gesamt-RNA die Messenger-RNA (mRNA) aufgereinigt und damit die DSS-Kontamination eliminiert. Hierzu wurde das *Dynabeads® mRNA Purification Kit* (Invitrogen) nach Hersteller-Vorgaben verwendet. Der Poly(A)-Schwanz der mRNA bindet über Wasserstoffbrücken an die kovalent an die *Microbeads* gekoppelten Oligo(dT)₂₅-Nukleotide. Durch ein starkes Magnetfeld wird die gebundene mRNA isoliert und durch Erwärmen auf 65 °C von den *Microbeads* anschließend eluiert.

Synthese von cDNA

Für die Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure (*complementary deoxyribonuclein acid*, cDNA) wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben benutzt. Es wurden 1000 ng Gesamt-RNA beziehungsweise 100 ng mRNA bei zuvor erfolgter Beads-Aufreinigung eingesetzt und das in Tabelle 2.11 aufgeführte PCR-Programm verwendet.

Schritt	Temperatur	Zeit (Minuten)
1.	25 °C	10:00
2.	37 °C	120:00
3.	85 °C	5:00
4.	4 °C	∞

Tabelle 2.11: PCR-Programm für die cDNA-Synthese

Quantitative Realtime PCR

Um die Expression verschiedener Gene zu messen, wurde eine quantitative Realtime-PCR (qPCR) mit TaqMan-Gene Expressionassays durchgeführt (siehe Kapitel 2.6). Das Pipettierschema ist in Tabelle 2.12 dargestellt.

Komponente	Menge
Fast advanced Mastermix	5 μ l
TaqMan Gene Expression Assay	0,5 μ l
cDNA	1 μ l
DEPC-behandeltes Wasser	3,5 μ l

Tabelle 2.12: Pipettierschema qPCR

Schritt	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Zeit (Minuten)
1.	50	2:00
2.	95	0:20
3.	95	0:01
4.	60	0:20

Tabelle 2.13: Programm qPCR. *Schritt 3. und 4. wurden 40x wiederholt.*

Die Versuche wurden mit einem StepOnePlus-Cycler nach dem in Tabelle 2.13 aufgeführten Programm durchgeführt. Die gemessenen Daten wurden zur Expression der *Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (Hprt)* als konstitutiv exprimiertes Gen normalisiert. Die Analyse jeder Probe erfolgte mindestens als Duplette. Für Proben, die kein detektierbares Signal zeigten, wurde für die statistische Auswertung und grafische Darstellung der Ct-Wert auf 40 festgelegt, entsprechend der maximalen Anzahl der durchlaufenen Zyklen.

2.12 Statistische Auswertung

Alle aufgeführten Werte sind - soweit nicht anders angegeben - als Mittelwert mit dem dazugehörigen Standardfehler angegeben. Das Signifikanzniveau für p-Werte wurde auf 5% festgelegt. Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurde bei zwei Behandlungsgruppen der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für die Signifikanztestung eingesetzt.

Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde ein Kruskal-Wallis-Rangsummentest durchgeführt. Unterschieden sich die Gruppen signifikant, schloss sich jeweils ein Wilcoxon-Mann-Whitney-Test der einzelnen Behandlungsgruppen gegen die Kontrollgruppe an. Hierfür wurde das Signifikanzniveau für multiples Testen nach Bonferoni korrigiert.

Zur Auswertung, graphischen Darstellung sowie zur Signifikanztestung wurde die Software GraphPadPrism 5.0 verwendet.

3. Ergebnisse

Im ersten Teil der Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die Induktion einer DSS-Kolitis auf die Entstehung einer Leberpathologie in gesunden Wildtyp-Mäusen hat. Hierzu wurde sowohl das Modell der akuten als auch der chronischen DSS-Gabe in C57Bl/6-Mäusen evaluiert. Anschließend wurde die chronische DSS-Gabe mit dem *Mdr2*^{-/-}-Modell einer chronischen Cholangitis kombiniert, um den Einfluss einer Kolitis auf eine bereits bestehende PSC-ähnliche Lebererkrankung festzustellen. Da bisher keine spezifische immunologische Zellpopulation als krankheitsverursachend identifiziert wurde, erfolgte zunächst eine breite Analyse möglichst vieler Populationen unter Verzicht auf eine Subgruppen-Spezifizierung. Zusätzlich wurde die Translokation von Bakterien über die Pfortader in die Leber als vermittelnder Mechanismus überprüft.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde an einem alternativen Kolitis-Modell überprüft, welche Effekte modellunabhängig auf die Darmentzündung zurückzuführen sind. Dazu wurde eine Kolitis durch den adoptiven Transfer *in vitro* differenzierter T-Zellen in *Rag1*^{-/-}-Mäuse induziert.

3.1 Akute DSS-Kolitis in C57Bl/6-Mäusen

Zunächst wurde geprüft, ob eine akute Kolitis eine Leberpathologie hervorruft. 12-14 Wochen alten C57Bl/6-Wildtyp-Mäusen wurde für 7 Tage eine 3%ige DSS-Lösung als Trinkwasser *ad libitum* angeboten. Am 10. Versuchstag erfolgte die Organentnahme und Zellisolation.

Die Tiere wurden täglich gewogen, um den Allgemeinzustand zu überwachen. Der Schweregrad der Kolitis wurde durch die Bestimmung der Kolonlänge sowie eine histologische Übersichtsfärbung überprüft, zusätzlich wurde bei einem Teil der Tiere am 10. Versuchstag das distale Kolon endoskopisch untersucht.

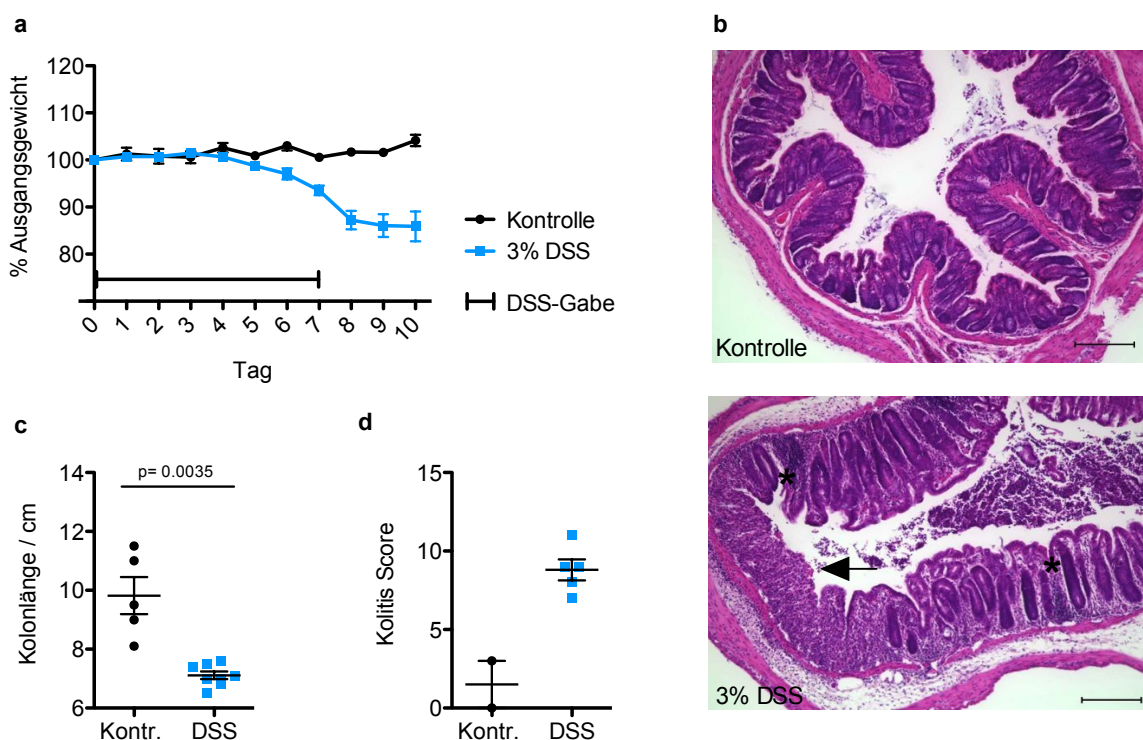


Abbildung 3.1: Erkrankungsschwere und Dickdarmentzündung bei akuter DSS-Kolitis. **a)** gemittelteltes prozentuales Gewicht im Verhältnis zu Tag 0 **b)** exemplarische HE-Übersicht bei 10x Vergrößerung; der Pfeil markiert eine Ulzeration, Immuneinfiltrate sind mit einem Stern markiert; Maßbalken: 200 μm **c)** Kolonlänge **d)** endoskopischer Kolitis-Score. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 2 Teilversuchen.

Die Charakterisierung der Kolitis anhand der Parameter Gewichtsverlust, Kolonlänge und endoskopischem Kolitis-Score ist in Abbildung 3.1 zusammengefasst. Während die Kontrolltiere ein konstantes Gewicht aufwiesen, reduzierte sich das Gewicht der behandelten Mäuse bis zum Versuchsende auf im Mittel 85,9% ihres Ausgangsgewichtes. Dazu passend zeigten die behandelten Mäuse eine mittelgradige makroskopische Entzündung der

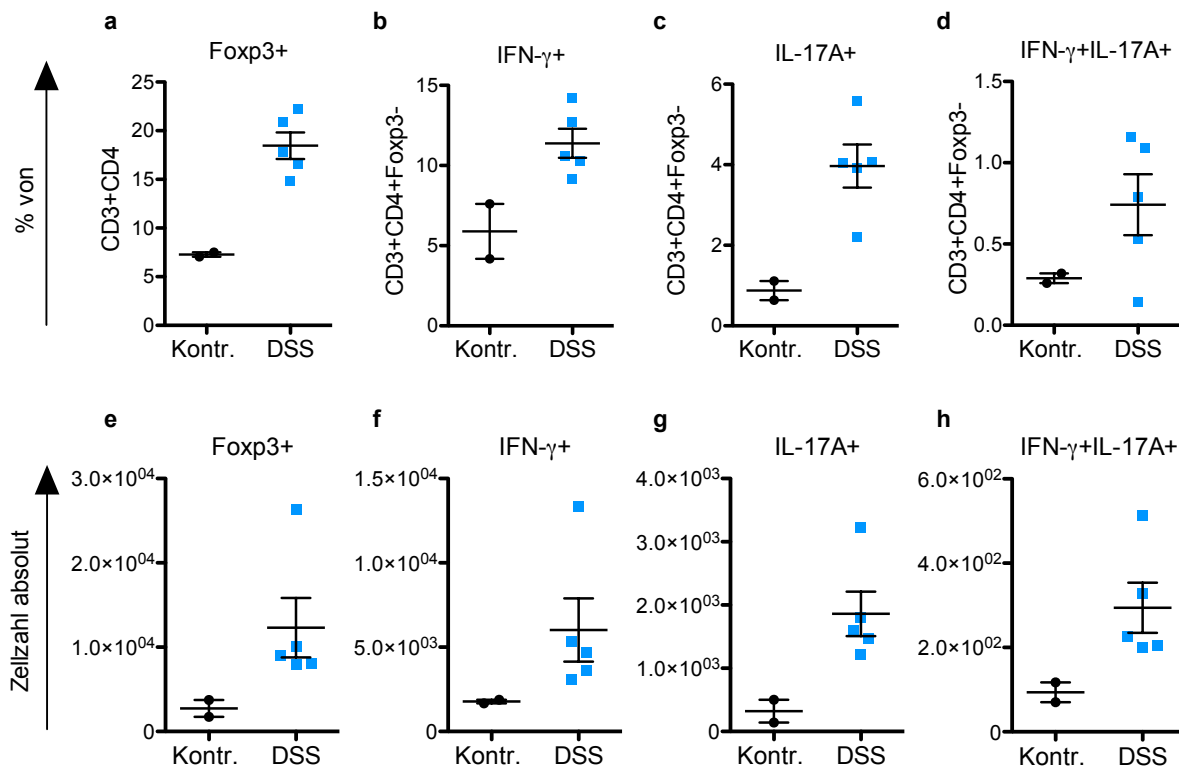


Abbildung 3.2: Durchflusszytometrische Charakterisierung der Dickdarmentzündung bei akuter DSS-Kolitis. **a)-d)** Frequenz von $Foxp3^+$, $IFN-\gamma^+$, $IL-17A^+$ sowie $IFN-\gamma^+IL-17A^+$ -T-Zellen **e)-h)** absolute Zellzahl von $Foxp3^+$, $IFN-\gamma^+$, $IL-17A^+$ sowie $IFN-\gamma^+IL-17A^+$ -T-Zellen. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Es erfolgte keine Signifikanztestung bei mangelnder Gruppengröße der Kontrollgruppe.

Kolonschleimhaut. Im endoskopischen Kolitis-Score wiesen sie einen durchschnittlichen Wert von 8,8 Punkten auf, während die Kontrolltiere einen mittleren Wert von 1,5 Punkten erreichten. Die DSS-behandelten Mäuse zeigten zudem eine signifikante Verkürzung des Kolons, die mittlere Länge betrug 7,1 cm im Vergleich zu 9,8 cm in der Kontrollgruppe ($p=0,0035$). Die histologische Untersuchung zeigte ebenfalls die erfolgreiche Induktion der Kolitis. Während die Kontrolltiere eine physiologische Kolonarchitektur aufwiesen, waren bei den behandelten Tieren Ulzerationen und entzündliche Infiltrate nachweisbar. Exemplarische mikroskopische Ausschnitte sind in Abbildung 3.1 b gezeigt.

Die Analyse der intestinalen T-Zell-Populationen im Kolongewebe zeigte einen Trend zur Zunahme von $Foxp3^+$, $IFN-\gamma^+$, $IL-17A^+$ sowie $IFN-\gamma^+IL-17A^+$ -T-Zellen sowohl in ihrer Frequenz als auch in der absoluten Zellzahl (Abbildung 3.2). Es erfolgte keine Signifikanztestung, da auf Grund eines technischen Fehlers bei einem Teil der Kontrolltiere die Zellisolation aus dem Kolongewebe fehlschlug und die Gruppengröße auf 2 Tiere reduziert wurde. In den folgenden Experimenten konnten die Ergebnisse allerdings im Modell der chronischen DSS-Kolitis bestätigt werden.

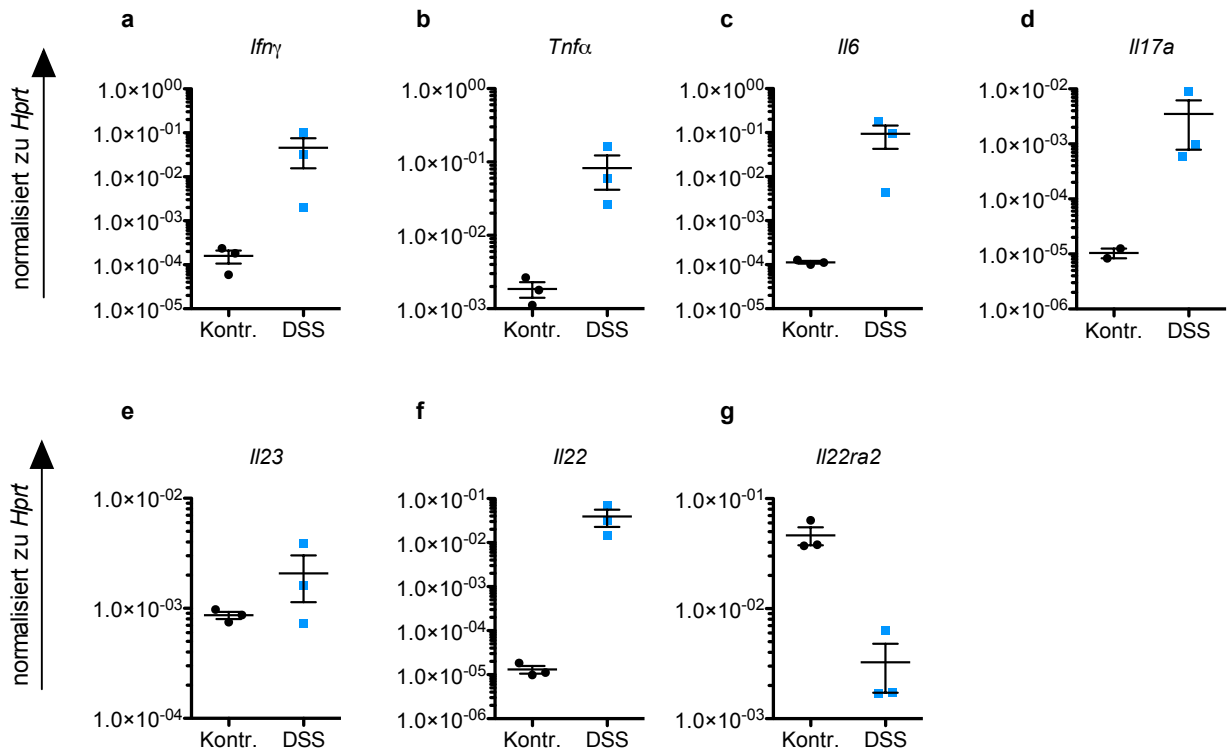


Abbildung 3.3: Expressionsmuster pro- und antiinflammatorischer Zytokine in Kolongewebe auf mRNA-Ebene an Tag 10 einer akuten DSS-Kolitis. Die gezeigten Werte wurden normalisiert zu *Hprt*. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt Ergebnisse aus 1 Teilversuch.

Um die Inflammation des Kolongewebes weitergehend zu charakterisieren, wurde aus den entnommenen Proben RNA aufgereinigt und mittels qPCR die Expression von entzündungstypischen Zytokinen quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 dargestellt: Die mRNA-Level der behandelten Mäuse für *Ifn γ* , *Tnf α* , *Il6*, *Il17* und *Il22* waren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren tendenziell erhöht, bei geringer Gruppengröße wurde kein statistisch signifikantes Ergebnis erreicht. Kein Unterschied zeigte sich in der Expression von *Il23*; für *Il22ra2* wiesen die behandelten Tiere in der Tendenz erniedrigte Expressions-Level auf.

Zusammenfassend wurde durch die 7-tägige DSS-Applikation eine mittelgradige Kolitis induziert, die makroskopisch wie mikroskopisch nachweisbar war und zu einer Veränderung der intestinalen T-Zell-Populationen sowie der lokalen Zytokinproduktion führte.

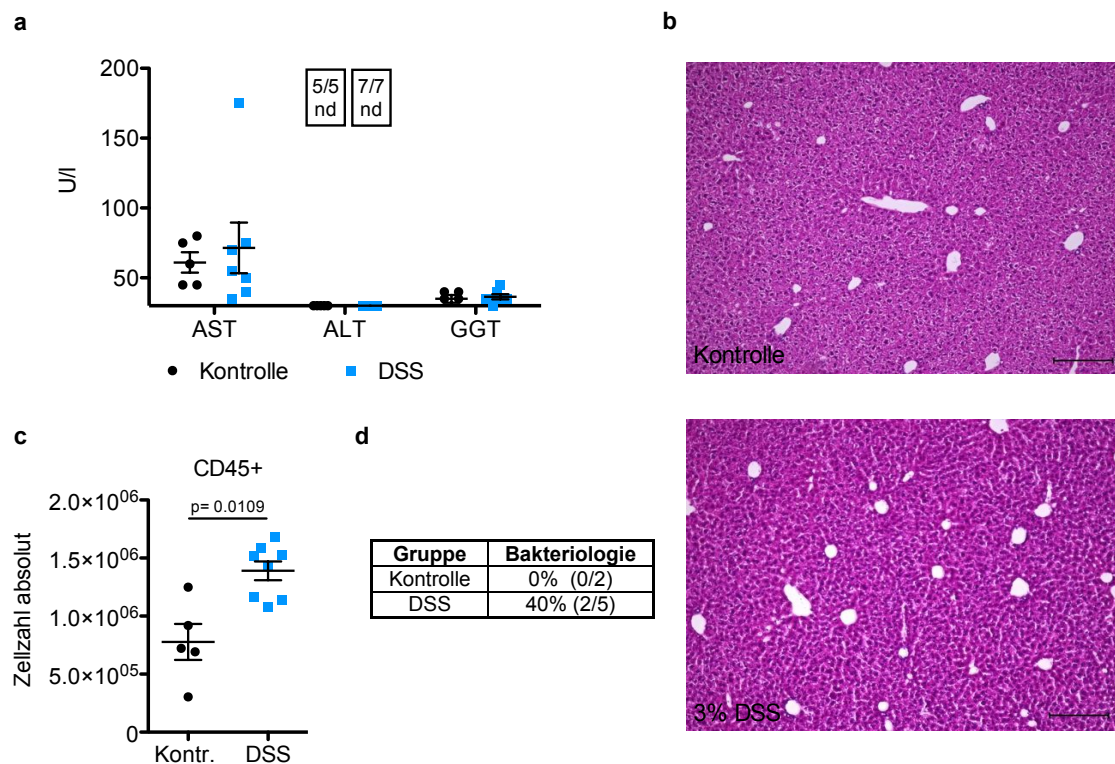


Abbildung 3.4: Quantifizierung der Leberpathologie bei akuter DSS-Kolitis. **a)** Serum-Level für AST, ALT und GGT, die untere Nachweisgrenze für ALT lag bei 30 U/l; nd= nicht detektierbar **b)** exemplarische HE-Übersicht 10x vergrößert, Maßbalken: 200 µm **c)** absolute Anzahl CD45⁺-Zellen **d)** Anteil der Tiere mit mindestens einem positivem Bakteriennachweis aus Kultur oder PCR. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 2 Teilversuchen.

Um den Einfluss der akuten Kolitis auf die Leber zu ermitteln, wurden verschiedene Parameter gemessen: Die Leberenzyme AST, ALT sowie GGT im Serum wurden als Marker eines generellen Leberschadens beziehungsweise einer Cholestase erhoben. Um eine Übersicht über mikroskopische Umbauvorgänge zu erhalten, wurde zudem eine HE-Färbung des Lebergewebes durchgeführt. Ergänzend wurde die Zusammensetzung der Immunzellen im Lebergewebe durchflusszytometrisch untersucht und durch eine mikrobielle Kultur sowie PCR aus homogenisiertem Lebergewebe auf eine Translokation von vitalen Bakterien beziehungsweise bakterieller 16S-rDNA getestet.

Die grundlegende Charakterisierung des Leber-Phänotyps ist in Abbildung 3.4 zusammengefasst: Für AST, ALT und GGT ließ sich kein Unterschied zwischen DSS-behandelten Mäusen und Kontrolltieren nachweisen. Auch in der histologischen Untersuchung ließen sich keine Unterschiede zwischen behandelten und nicht behandelten Tieren feststellen, exemplarische mikroskopische Ausschnitte sind in Abbildung 3.4 b gezeigt. Bei 2 aus 5 DSS-behandelten Tieren war mindestens ein Nachweis für eine bakterielle Translokation

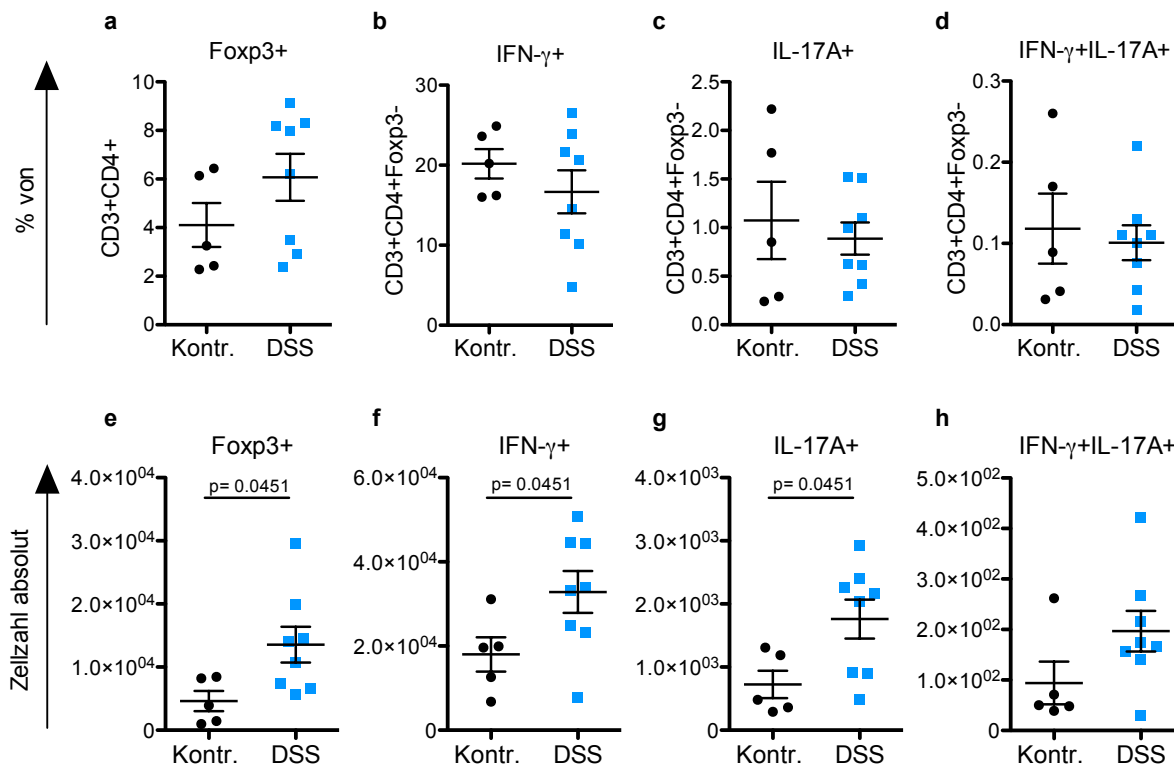


Abbildung 3.5: Hepatische T-Zellen im Modell der akuten DSS-Kolitis. **a)-d)** Frequenz von $Foxp3^{+}$ -, $IFN-\gamma^{+}$ -, $IL-17A^{+}$ - sowie $IFN-\gamma^{+}IL-17A^{+}$ -T-Zellen **e)-h)** absolute Zellzahl von $Foxp3^{+}$ -, $IFN-\gamma^{+}$ -, $IL-17A^{+}$ - sowie $IFN-\gamma^{+}IL-17A^{+}$ -T-Zellen. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 2 Teilversuchen.

(aus aerober beziehungsweise anaerober Kultur sowie PCR auf 16S-rDNA) positiv, während bei den 2 Kontrolltieren keine bakterielle Translokation nachweisbar war. Zudem zeigte sich eine erhöhte absolute Anzahl an $CD45^{+}$ -Immunzellen ($p=0,0109$, Abbildung 3.4 c).

Für die weitere Differenzierung der $CD45^{+}$ -Zellen wurde ein Teil der Zellen restimuliert, um eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchzuführen (siehe Abbildung 3.5), die restlichen Zellen wurden lediglich extrazellulär mit Antikörpern gefärbt (siehe Abbildung 3.6). Die Gating-Strategien sind exemplarisch in Abbildung 2.3 und 2.4 gezeigt.

In der intrazellulären Zytokinfärbung waren keine Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Tieren hinsichtlich der Frequenz von $Foxp3^{+}$ -, $IFN-\gamma^{+}$ -, $IL-17A^{+}$ - sowie $IFN-\gamma^{+}IL-17A^{+}$ -T-Zellen feststellbar (siehe Abbildung 3.5 a-d). Für die absoluten Zellzahlen konnte eine signifikante Erhöhung der $Foxp3^{+}$ -, $IFN-\gamma^{+}$ -, $IL-17A^{+}$ -T-Zellen nach DSS-Gabe gezeigt werden (jeweils $p=0,0451$). Für $IFN-\gamma^{+}IL-17A^{+}$ -T-Zellen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

Die Analyse der extrazellulär gefärbten hepatischen Immunzellen wies in der Frequenz tendenzielle Unterschiede zwischen DSS-behandelten und Kontrolltieren auf: In der Be-

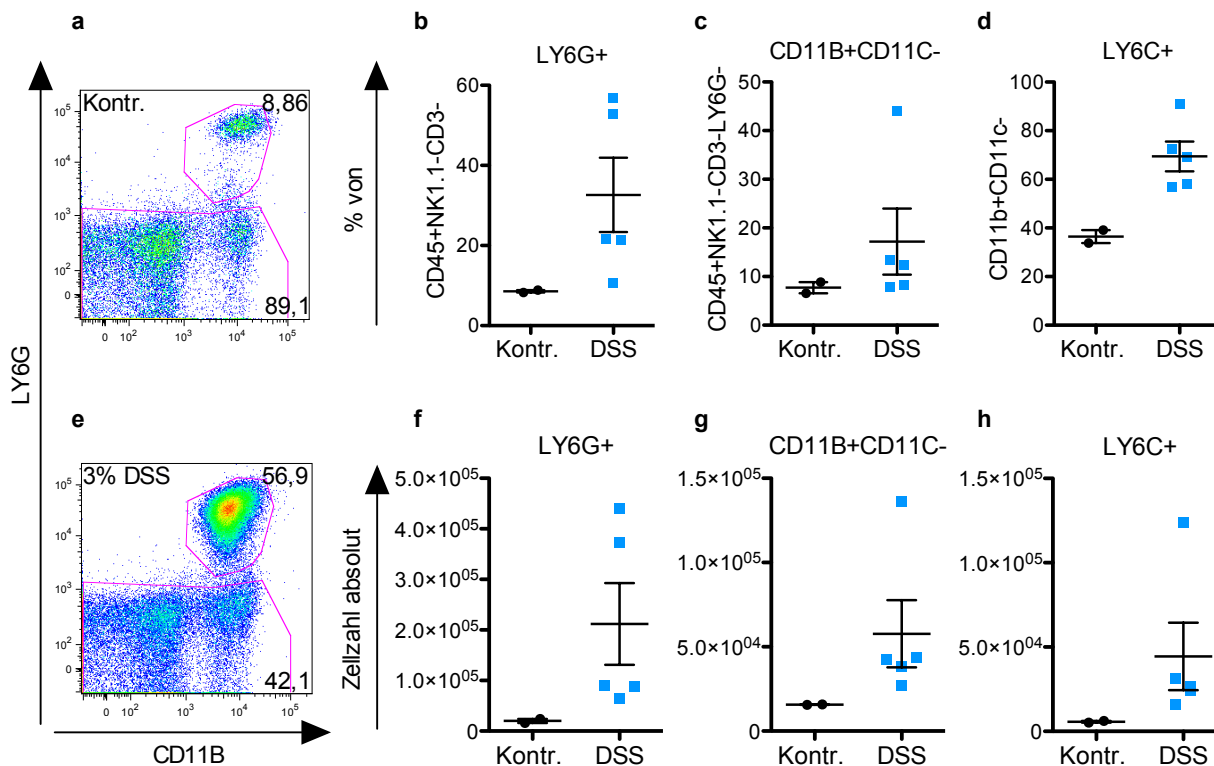


Abbildung 3.6: Hepatische Immunzellen des angeborenen Immunsystems an Tag 10 einer akuten DSS-Kolitis. **a),e)** exemplarische Scatter-Plots LY6G⁺-Zellen: **a)** Kontrollgruppe **e)** 3% DSS-Gruppe **b)-d)** Frequenz von LY6G⁺-, CD11B⁺CD11C⁻- sowie LY6C⁺-Zellen **f)-h)** absolute Zellzahl von LY6G⁺-, CD11B⁺CD11C⁻- sowie LY6C⁺-Zellen. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier.

handlungsgruppe exprimierten durchschnittlich 32,6% der CD45⁺CD3⁻NK1.1⁻- Zellen den Neutrophilen-Marker LY6G im Vergleich zu durchschnittlich 8,6% in der Kontrollgruppe. Zusätzlich war die Frequenz der LY6C⁺-Zellen aus den CD11B⁺CD11C⁻-Zellen in der Behandlungsgruppe auf im Mittel 69,4% im Vergleich zu 36,5% in der Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 3.6 a,b,d). Für die Frequenz von CD3⁺NK1.1⁺-, CD3⁺NK1.1⁻- sowie CD11B⁺CD11C⁺-Zellen konnte kein Unterschied nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt). Erhöhte absolute Zellzahlen nach DSS-Behandlung lagen neben den schon in der Frequenz erhöhten LY6G⁺ Zellen und LY6C⁺ -Zellen auch für die CD11B⁺CD11C⁻-Zellen vor. Aufgrund der geringen Anzahl der Kontrolltiere erfolgte keine Signifikanztestung.

Um zu überprüfen, ob die veränderte zelluläre Zusammensetzung und erhöhte Zellzahl einen Effekt auf die Expression verschiedener Zytokine in der Leber hat, wurde mRNA aus hepatischem Gewebe isoliert und anschließend eine qPCR durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7 dargestellt: Zwischen behandelten und unbehandelten Tieren ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied auf mRNA-Level für die Expression von *Ifn γ* , *Tnfa*, *Il6*, sowie *Il23* ermitteln. Die mRNA-Level für *Il17a*, *Il22* und *Il22ra2* lagen

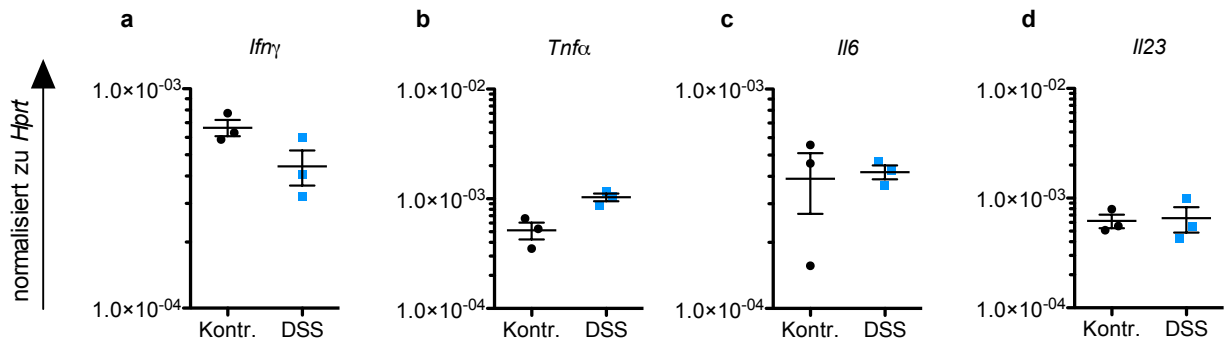


Abbildung 3.7: Expressionsmuster proinflammatorischer Zytokine im Lebergewebe auf mRNA-Ebene an Tag 10 einer akuten DSS-Kolitis. Die gezeigten Werte wurden normalisiert zu *Hprt*. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt Ergebnisse aus 1 Teilversuch.

unterhalb der Nachweisgrenze (Ergebnisse nicht dargestellt).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die akute DSS-induzierte Kolitis die Anzahl der CD45⁺-Immunzellen insgesamt sowie die Frequenz und absolute Zellzahl einzelner Immunzellen in der Leber erhöht wurde, aber kein genereller Leberschaden im Sinne einer histologischen Infiltration oder einer hepatischen Zellschädigung und einer damit einhergehenden Transaminasenerhöhung verursacht wurde.

Für einige Parameter variiert die Anzahl der Versuchstiere, da in einem Teilversuch auf Grund eines technischen Fehlers eine Analyse der isolierten Zellen nicht möglich war beziehungsweise das Endoskop nicht zur Verfügung stand.

3.2 Chronische DSS-Kolitis in C57Bl/6-Mäusen

Da eine akute DSS-Kolitis keine manifeste Leberschädigung hervorrief, wurde im nächsten Schritt das chronische Modell der DSS-Kolitis angewendet, welches einen chronischen und schubweisen Krankheitsverlauf nachbildet. Hierbei wurde die DSS-Lösung in drei Zyklen für 5, 5 und 7 Tage verabreicht. Zwischen den Zyklen erhielten die Mäuse 16 Tage autoklaviertes Leitungswasser. Die Schwere der Kolitis wurde während des Versuchs über den Gewichtsverlust sowie die Erhebung des endoskopischen Kolitis-Scores überwacht, nach Versuchsende wurde zusätzlich die Kolonlänge bestimmt. Diese Basisparameter sind in Abbildung 3.8 zusammengefasst.

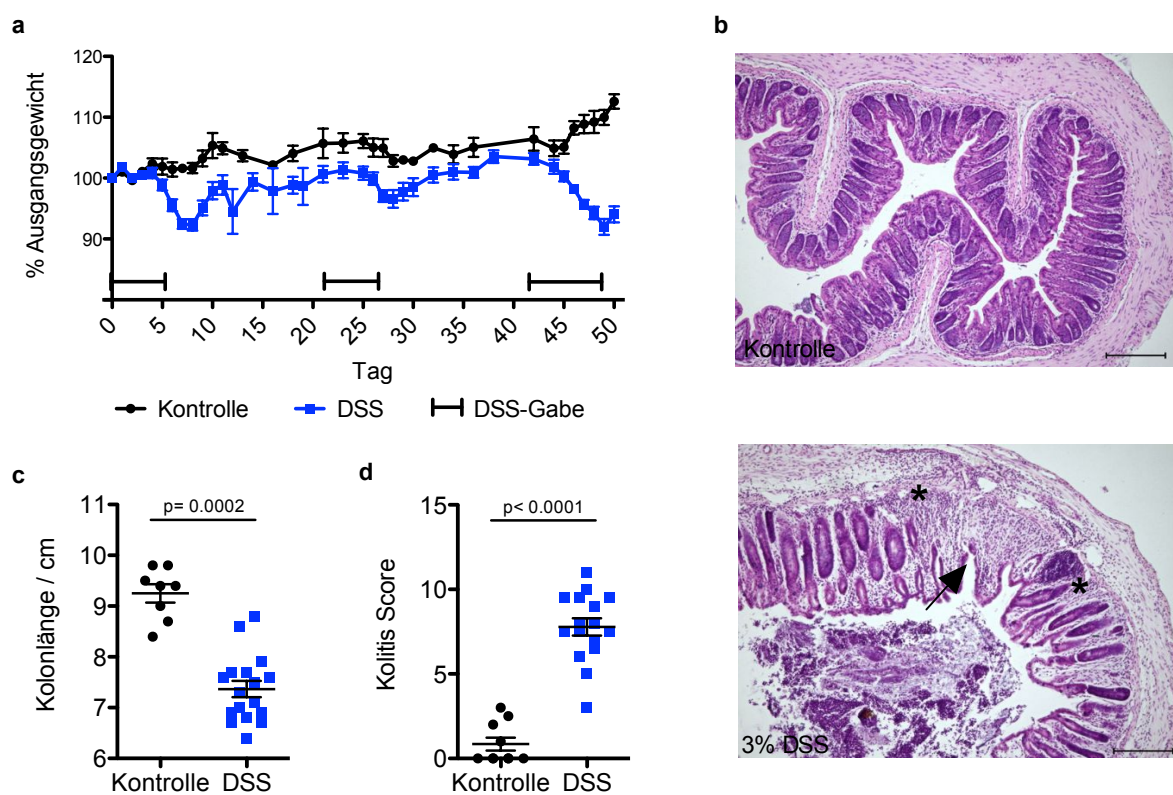


Abbildung 3.8: Erkrankungsschwere und Dickdarmentzündung bei chronischer DSS-Kolitis. **a)** gemittelttes prozentuales Gewicht im Verhältnis zu Tag 0 **b)** exemplarische HE-Übersicht bei 10x Vergrößerung: der Pfeil markiert eine Ulzeration, Infiltrationen durch Immunzellen sind mit einem Stern markiert; Maßbalken: 200 μm **c)** Kolonlänge **d)** endoskopischer Kolitis-Score nach dem 3. Behandlungszyklus. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 2 Teilversuchen.

Nach jedem DSS-Zyklus zeigte sich ein Gewichtsverlust der behandelten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, zwischen den Zyklen erreichten die DSS-behandelten Tiere etwa ihr Ausgangsgewicht, während die Kontrolltiere über den Versuchsverlauf zunahmen.

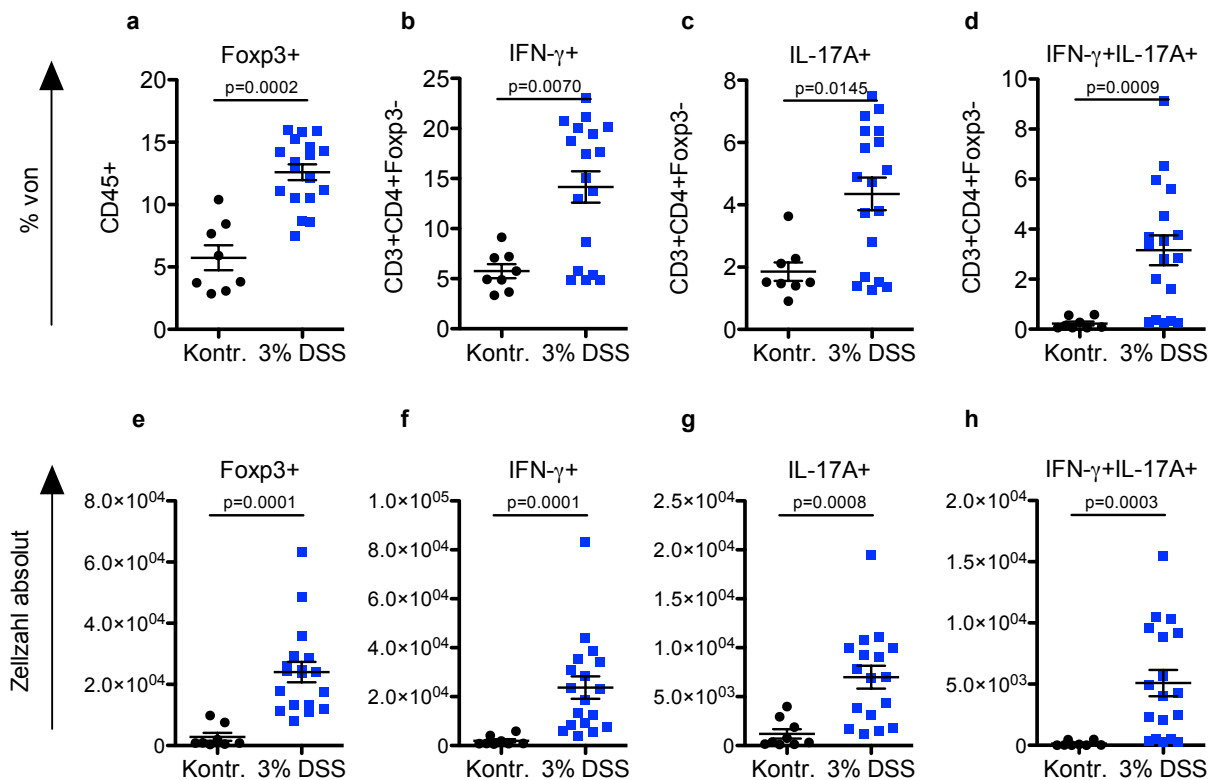


Abbildung 3.9: Durchflusszytometrische Charakterisierung der Dickdarmentzündung bei chronischer DSS-Kolitis. **a)-d)** Frequenz von $Foxp3^{+}$ -, $IFN-\gamma^{+}$ -, $IL-17A^{+}$ - sowie $IFN-\gamma^{+}IL-17A^{+}$ -T-Zellen **e)-h)** absolute Zellzahl von $Foxp3^{+}$ -, $IFN-\gamma^{+}$ -, $IL-17A^{+}$ - sowie $IFN-\gamma^{+}IL-17A^{+}$ -T-Zellen. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 2 Teilversuchen.

Nach dem letzten Zyklus wiesen die unbehandelten Tiere durchschnittlich 112,5%, die behandelten Tiere 94% ihres Ausgangsgewichts auf (siehe Abbildung 3.8 a). Die Kolonlänge und der Kolitis-Score zeigten ebenfalls die Erkrankungsschwere: In der DSS-Gruppe verkürzte sich die Kolonlänge im Mittel auf 7,4 cm im Vergleich zu 9,3 cm ($p=0,0002$); der Kolitis-Score lag im Durchschnitt bei 7,8 Punkten im Vergleich zu 0,9 Punkten in der Vergleichsgruppe ($p<0,0001$). Die Entzündung war auch in der histologischen Untersuchung sichtbar; repräsentative mikroskopische Aufnahmen, die nach DSS-Behandlung eine Ulzeration sowie Zellinfiltrate zeigen, sind in Abbildung 3.8 b gezeigt.

Die durchflusszytometrische Untersuchung der einzelnen intestinalen T-Zell-Populationen zeigte den Effekt der DSS-Gabe (Abbildung 3.9): Die Frequenz an $Foxp3^{+}$ -, $IFN-\gamma^{+}$ -, $IL-17A^{+}$ - sowie $IFN-\gamma^{+}IL-17A^{+}$ -T-Zellen stieg signifikant an. Den höchsten absoluten Wert erreichten hierbei die $IFN-\gamma^{+}$ -T-Zellen mit 14,2% im Vergleich zu 5,8% in der Kontrollgruppe ($p=0,00740$). Die absoluten Zellzahlen waren nach DSS-Behandlung ebenfalls für alle Populationen im Vergleich zu der Kontrollgruppe erhöht.

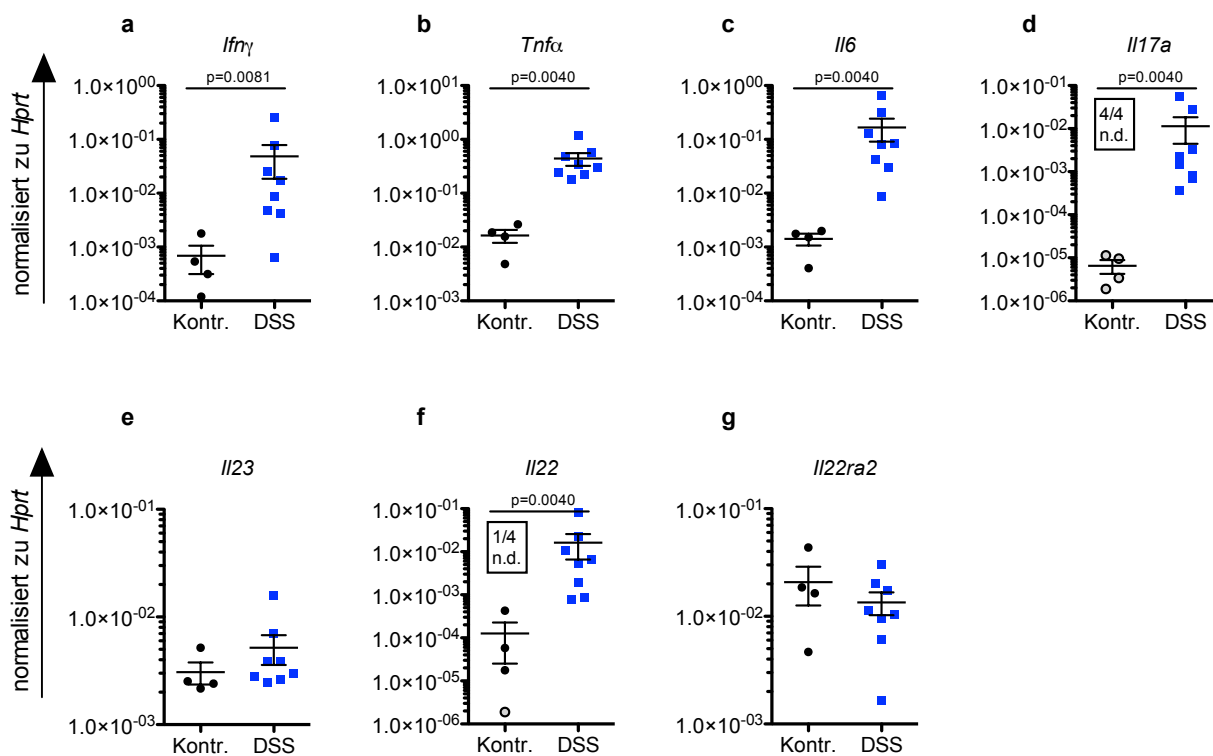


Abbildung 3.10: Expressionsmuster pro- und antiinflammatorischer Zytokine in Dickdarmgewebe auf mRNA-Ebene nach chronischer DSS-Kolitis. Die Werte wurden normalisiert zu *Hprt*. *nd*= nicht detektierbar, für diese Proben wurde der *Ct*-Wert auf 40 gesetzt, sie sind jeweils als grau gefüllte Symbole dargestellt. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt Ergebnisse aus 1 Teilversuch, diese ließen sich in 2 weiteren Teilversuchen bestätigen.

Auf mRNA-Ebene waren nach DSS-Behandlung die Level für *Ifn γ* , *Tnf α* , *Il6*, *Il17* und *Il22* signifikant erhöht (siehe Abbildung 3.10). Kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen war für die Expression von *Il23* sowie *Il22ra2* nachweisbar.

Zusammenfassend wurde durch die chronische DSS-Gabe eine rezidivierende mittelgradige Kolitis induziert. Im Vergleich zwischen akutem und chronischem Modell lag eine ähnliche Schwere der Erkrankung nach dem 3. Zyklus und nach der einmaligen akuten Gabe vor. Es zeigten sich analoge Ergebnisse bezüglich der Frequenzen der meisten intestinalen T-Zell-Populationen, für die IFN- γ^+ IL-17A $^+$ -T-Zellen lag nach chronischer Kolitis eine deutlichere Erhöhung der Frequenz auf 3,2% im Vergleich zu 0,7% vor bei ähnlichen Frequenzen in den Kontrollgruppen. Die absoluten Zellzahlen zeigten für alle analysierten T-Zell-Populationen eine deutlichere Erhöhung im chronischen Modell bei vergleichbaren Ergebnissen im gesunden Kolongewebe der jeweiligen Kontrollgruppe. Auf mRNA-Ebene zeigten sich für beide Modelle ähnliche Expressionsmuster der getesteten Gene im Kolongewebe.

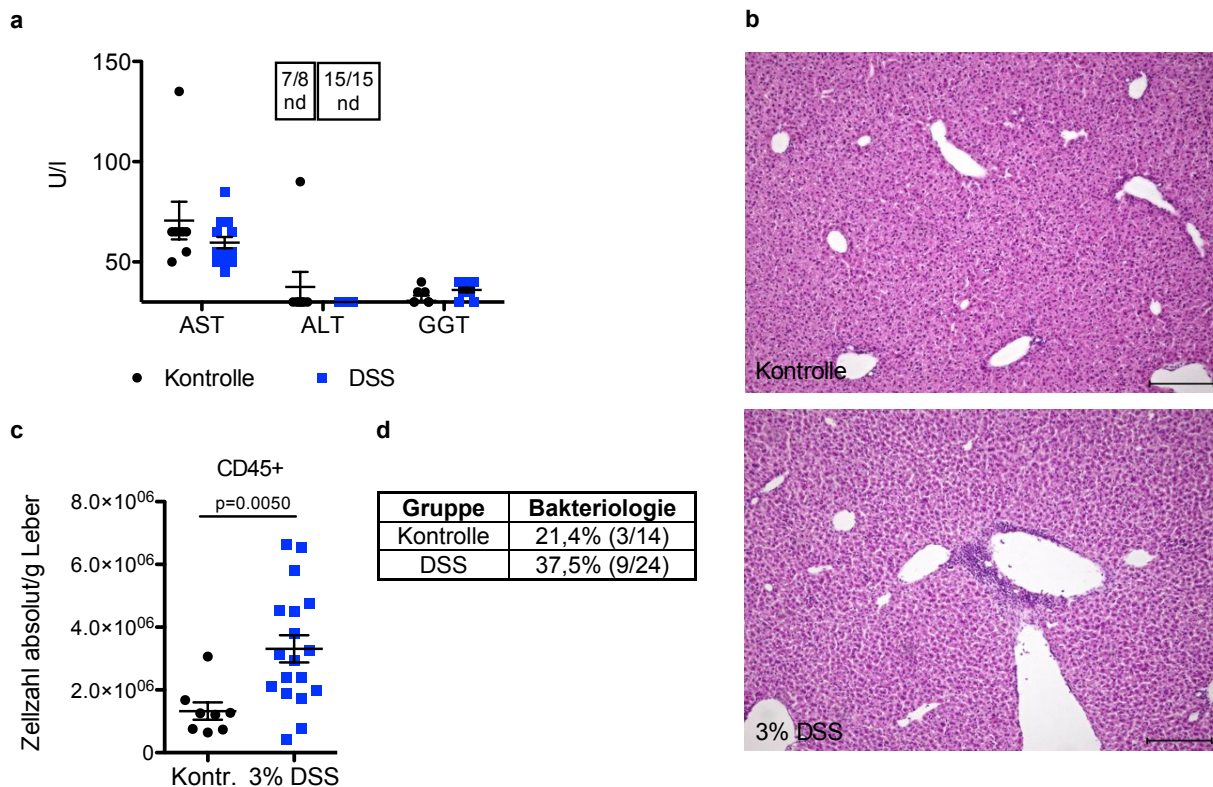


Abbildung 3.11: Quantifizierung der Leberpathologie bei chronischer DSS-Kolitis. **a)** Serum-Level für AST, ALT und GGT, die untere Nachweisgrenze für ALT lag bei 30 U/l; nd= nicht detektierbar, für diese Werte wurde das untere Detektionslimit angenommen **b)** exemplarische HE-Übersicht 10x vergrößert, Maßbalken: 200 μm **c)** absolute Anzahl CD45⁺-Zellen ($p=0,0109$) **d)** Anteil der Tiere mit mindestens einem positivem Bakteriennachweis aus Kultur oder PCR. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 2 Teilversuchen.

Nachdem durch die akute DSS-Kolitis keine pathologische Veränderung der Leber induziert wurde, erfolgte die analoge Analyse des Lebergewebes nach Ablauf einer chronischen Kolitis. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.11 zusammenfassend dargestellt. Es zeigte sich keine Erhöhung der Leberenzyme AST, ALT beziehungsweise GGT als Indikator für eine globale Leberschädigung oder Cholestase im peripheren Blut. Histologisch waren keine massiven Veränderungen der Gewebestruktur im Sinne einer Fibrosierung oder Sklerosierung sichtbar, allerdings ließen sich einige unspezifische Infiltrate des Lebergewebes darstellen. Ein Beispiel ist in Abbildung 3.11 b abgebildet. In der Kontrollgruppe war für 3 aus 14 Tieren (21,4%) einer der mikrobiologischen Tests zum Nachweis von Bakterien im Lebergewebe positiv, für die Behandlungsgruppe war dies für 9 aus 24 Tieren (37,5%) der Fall. Die Gesamtanzahl an hepatischen CD45⁺-Zellen als Hinweis auf die Menge der Immunzellen zeigte sich nach DSS-Behandlung signifikant erhöht ($p=0,0050$; siehe Abbildung 3.11c).

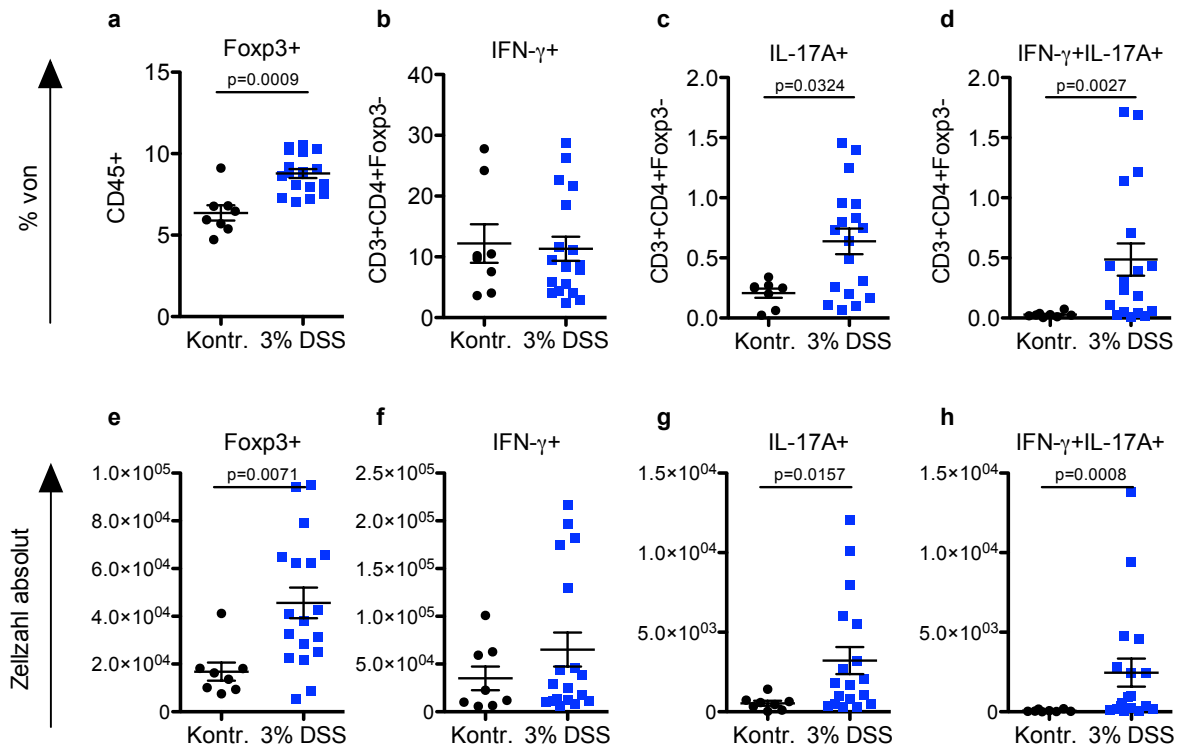


Abbildung 3.12: Durchflusszytometrische Charakterisierung der hepatischen T-Zellen bei chronischer DSS-Kolitis. **a)-d)** Frequenz von $Foxp3^{+}$ -, $IFN-\gamma^{+}$ -, $IL-17A^{+}$ - sowie $IFN-\gamma^{+}IL-17A^{+}$ -T-Zellen **e)-h)** absolute Zellzahl von $Foxp3^{+}$ -, $IFN-\gamma^{+}$ -, $IL-17A^{+}$ - sowie $IFN-\gamma^{+}IL-17A^{+}$ -T-Zellen. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 2 Teilversuchen.

Die weitere Differenzierung der hepatischen CD45⁺-Zellen ist in den Abbildungen 3.12 und 3.13 aufgeführt. Ein Teil der Zellen wurde restimuliert und fixiert, um die T-Zell-Populationen zu analysieren: Signifikant erhöhte Frequenzen lagen in der Behandlungsgruppe für $Foxp3^{+}$ -, $IL-17A^{+}$ - sowie $IFN-\gamma^{+}IL-17A^{+}$ -T-Zellen vor. Für diese Zellpopulationen zeigten sich auch die absoluten Zellzahlen nach DSS-Behandlung erhöht im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Die Frequenz und absolute Zellzahl von $IFN-\gamma^{+}$ -T-Zellen unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen.

In einer zweiten FACS-Färbung erfolgte lediglich eine extrazelluläre Markierung (siehe Abbildung 3.13). Hier wurde durch die chronische DSS-Kolitis im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte Frequenz an $LY6G^{+}$ - und $LY6C^{+}$ -Zellen hervorgerufen. Die $LY6G^{+}$ -Frequenz erhöhte sich auf 25,0% im Vergleich zu 10,8% in der Kontrollgruppe ($p=0,0009$); die $LY6G^{+}$ -Frequenz stieg von 64,9% auf 77,0% ($p=0,0005$). Kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand für $CD11B^{+}CD11C^{-}$ - sowie $CD11B^{+}CD11C^{+}$ -Zellen (sie-

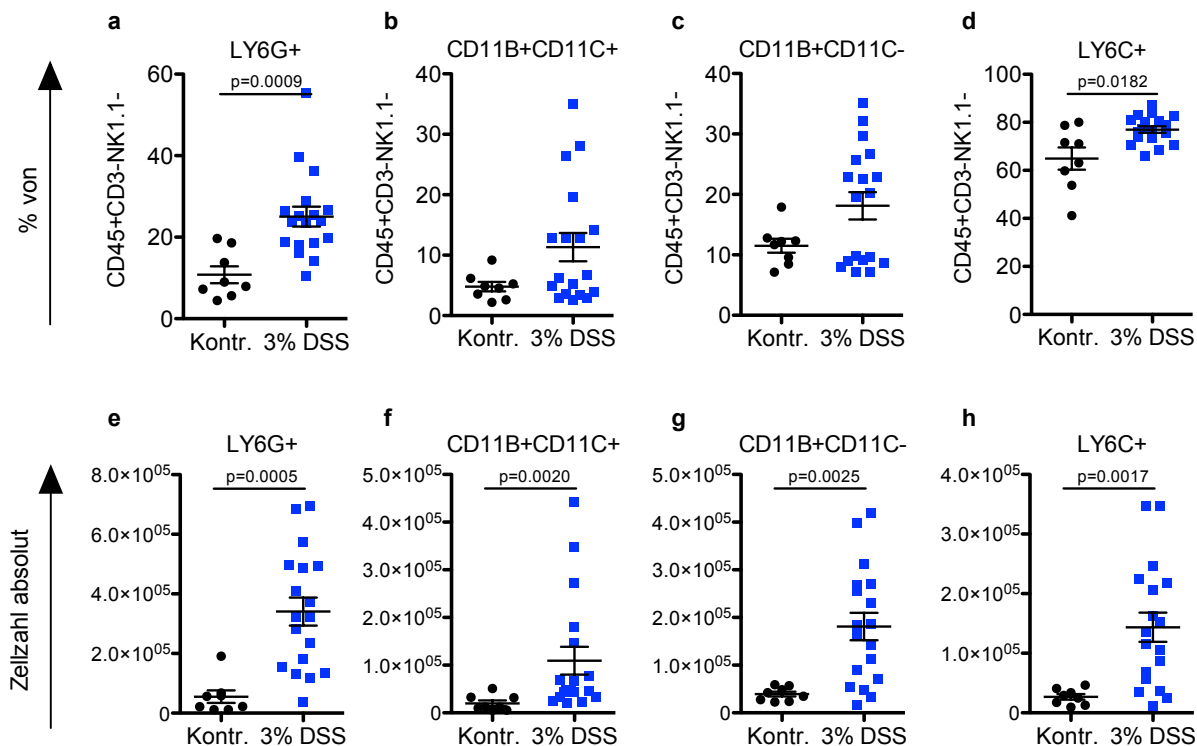


Abbildung 3.13: FACS-Analyse hepatischer Zellen des angeborenen Immunsystems bei chronischer DSS-Kolitis. **a-c)** Frequenz von $LY6G^+$ -, $CD11B^+ CD11C^+$ -, $CD11B^+ CD11C^-$ - sowie $LY6C^+$ -Zellen **d-f)** absolute Anzahl von $LY6G^+$ -, $CD11B^+ CD11C^+$ -, $CD11B^+ CD11C^-$ - sowie $LY6C^+$ -Zellen. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 2 Teilversuchen.

he Abbildung 3.13b, c); eine erniedrigte Frequenz nach DSS-Behandlung zeigten die $CD3^+NK1.1^+$ - und $CD3^-NK1.1^+$ -Zellen (Daten nicht gezeigt.)

Die absolute Zellzahl an $LY6G^+$ -, $CD11B^+CD11C^-$ -, $CD11B^+CD11C^+$ - sowie $LY6C^+$ -Zellen war signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 3.13 e-h). Für die $CD3^+NK1.1^+$ - und $CD3^-NK1.1^+$ -Zellen war kein statistisch signifikanter Unterschied in der Zellanzahl nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchung der Genexpression im Lebergewebe ist in Abbildung 3.14 dargestellt, hier zeigte sich für einige Gene ebenfalls eine Veränderung durch die DSS-Kolitis: Zwischen behandelten und unbehandelten Tieren ließ sich ein statistisch signifikanter Unterschied für die Expression von *Tnfa*, *Il6*, sowie *Ccl2* ermitteln. Kein signifikanter Unterschied in der Expression war für *Ifn γ* , *Il23*, *Mmp8* sowie *Nos2* nachweisbar. *Nos2* zeigte mit einem p-Wert von 0,0823 einen Trend zur Erhöhung nach DSS-Gabe. Die mRNA-Level für *Il17a*, *Il22* und *Il22ra2* lagen unterhalb der Nachweisgrenze (Ergebnisse nicht dargestellt).

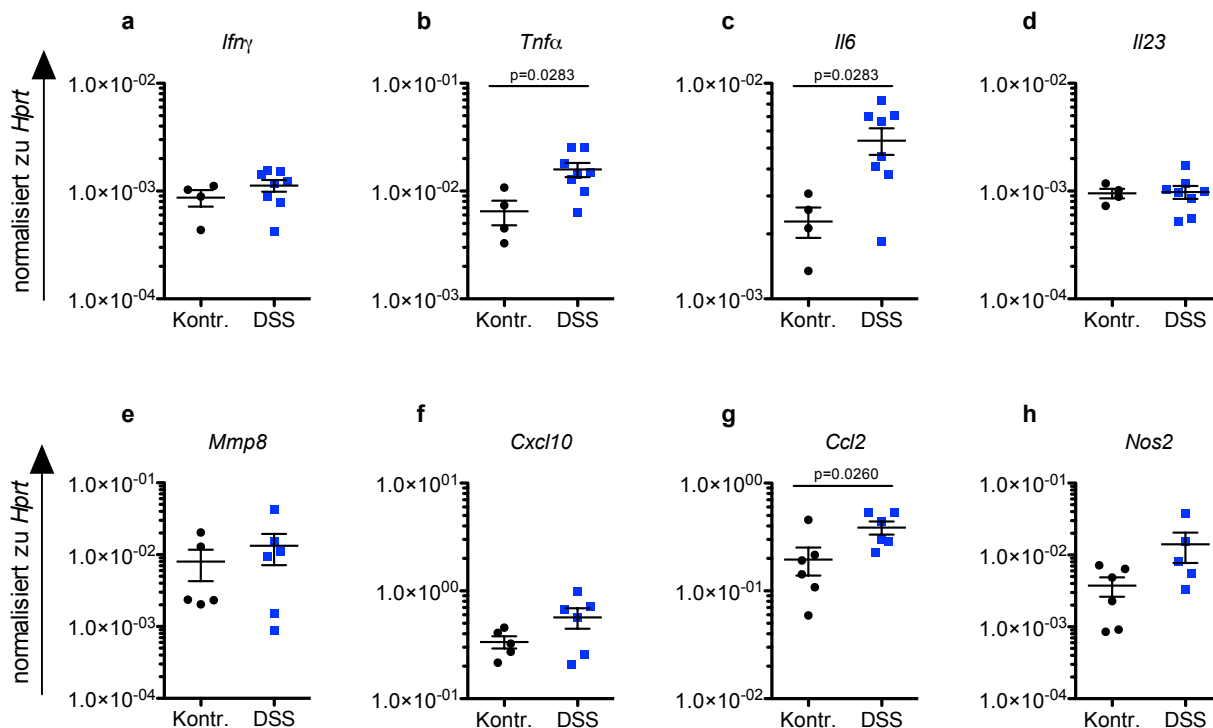


Abbildung 3.14: Expressionsmuster pro- und antiinflammatorischer Zytokine in Lebergewebe auf mRNA-Ebene nach chronischer DSS-Kolitis. Die gezeigten Werte wurden normalisiert zu *Hprt*. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt für a-d Ergebnisse aus 1 Teilversuch, diese ließen sich in 2 weiteren Teilversuchen bestätigen. Die Daten der in e-h dargestellten Gene stammen aus 1 Teilversuch.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich auch nach chronischer DSS-Kolitis kein manifester Leberschaden im Sinne einer Fibrosierung bildet. Es zeigen sich - im Gegensatz zum akuten Modell - jedoch immunologische Infiltrate im Lebergewebe. Es ließen sich im chronischen Modell absolut betrachtet mehr CD45⁺-Zellen im Lebergewebe nachweisen, insgesamt zeigten diese jedoch eine ähnliche Komposition. Leichte Unterschiede bestanden auf mRNA-Ebene, hier zeigte sich eine erhöhte *Il6*-Expression im Lebergewebe im chronischen Modell, während diese im akuten Modell nicht bestand.

3.3 Chronische DSS-Kolitis in Mäusen mit genetischer Leberpathologie

Nachdem die chronische DSS-Kolitis eine deutliche Erhöhung der CD45⁺-Zellen in der Leber hervorrief, dies aber keine Schädigung der Leber verursachte, wurde im nächsten Schritt der Einfluss einer chronischen Inflammation auf Mäuse mit Knockouts des *Mdr2*-Gens untersucht. Diese Tiere entwickeln durch das Fehlen des *Multidrug-resistance-Gens 2* PSC-ähnliche Läsionen der Leber [114]. Die chronische DSS-Kolitis wurde analog zu den Versuchen mit C57Bl/6-Mäusen in drei Zyklen induziert und der Einfluss der Kolitis auf die bereits bestehende Leberpathologie charakterisiert. Da durch die Kombination zweier Krankheitsmodelle eine stärkere Erkrankung der Tiere zu erwarten war, wurde eine 2,5%ige DSS-Lösung verwendet.

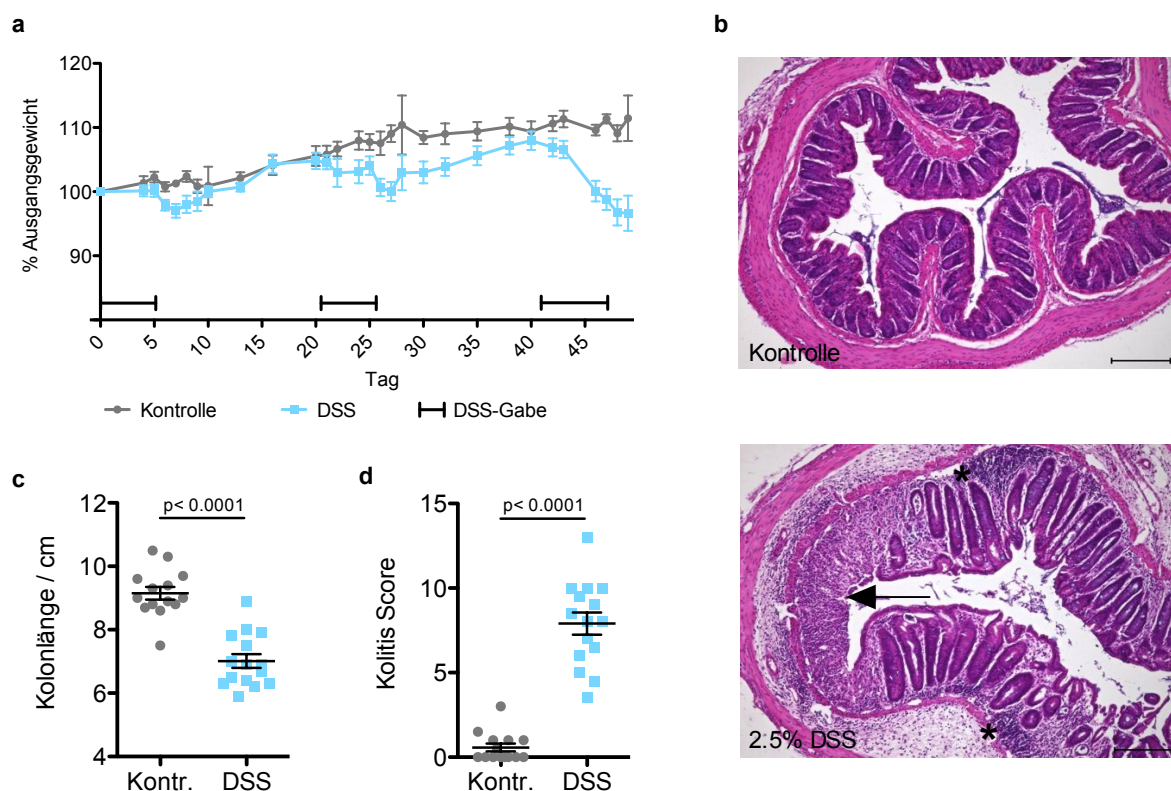


Abbildung 3.15: Erkrankungsschwere bei chronischer DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-}-Mäusen. **a)** gemittelttes prozentuales Gewicht im Verhältnis zu Tag 0 **b)** exemplarische HE-Übersicht bei 10x Vergrößerung; der Pfeil markiert eine Ulzeration, Infiltrationen durch Immunzellen sind mit einem Stern markiert; Maßbalken: 200 µm **c)** Kolonlänge **d)** endoskopischer Kolitis-Score. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 3 Teilversuchen.

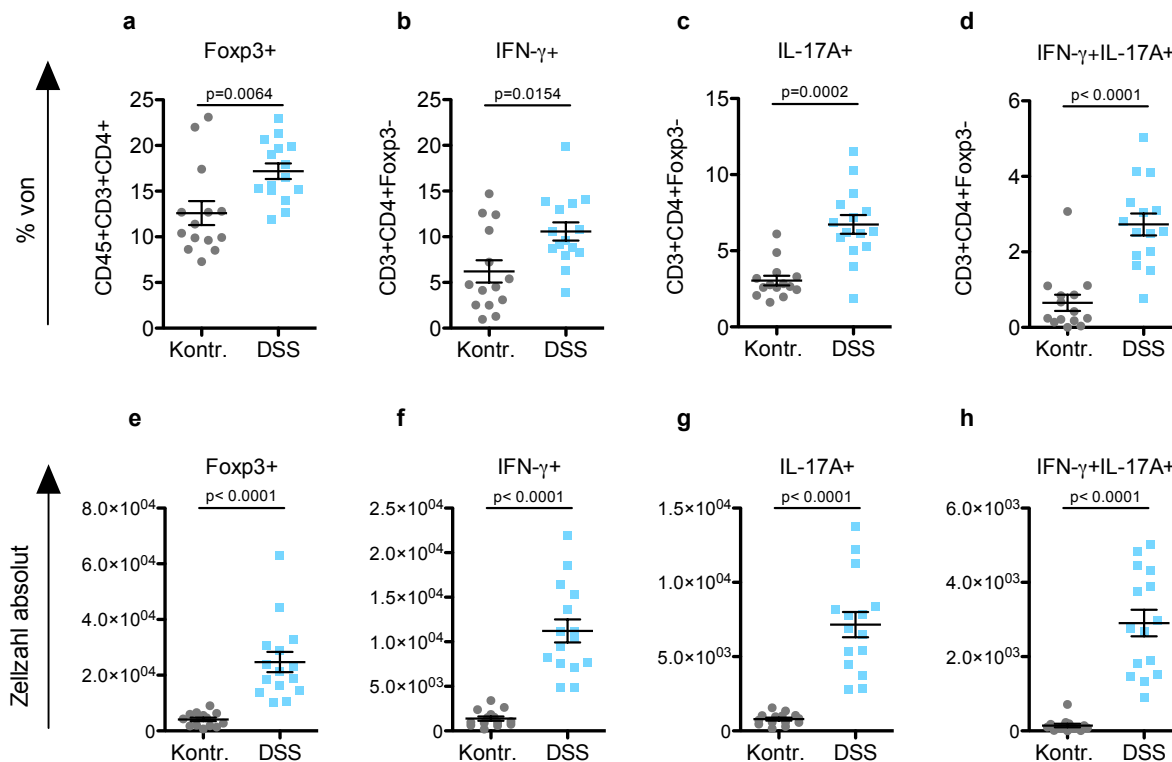


Abbildung 3.16: Durchflusszytometrische Charakterisierung der Dickdarmentzündung bei chronischer DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-}-Mäusen. **a)-d)** Frequenz von *Foxp3*⁺-, *IFN-γ*⁺-, *IL-17A*⁺- sowie *IFN-γ*⁺*IL-17A*⁺-T-Zellen **e)-h)** absolute Zellzahl von *Foxp3*⁺-, *IFN-γ*⁺-, *IL-17A*⁺- sowie *IFN-γ*⁺*IL-17A*⁺-T-Zellen. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 3 Teilversuchen.

Zunächst wurde die Induktion und Schwere der DSS-Kolitis überprüft, die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Die behandelten Tiere zeigten nach jedem DSS-Zyklus eine Gewichtsabnahme beziehungsweise eine fehlende Gewichtszunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach dem dritten Zyklus lag das Gewicht der DSS-Gruppe im Mittel bei 96,6%, in der Kontrollgruppe wogen die Tiere durchschnittlich 111,5% ihres Ausgangsgewichtes. Die Kolonlänge war nach DSS-Gabe auf 7,0 cm im Vergleich zu 9,2 cm in der Kontrollgruppe verkürzt ($p < 0,0001$); der Kolitis-Score lag bei 7,9 Punkten im Vergleich zu 0,6 Punkten in der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). Repräsentative mikroskopische Aufnahmen sind in Abbildung 3.15 b gezeigt, nach DSS-Kolitis waren Ulzerationen, ein Verlust der Kolonarchitektur sowie Zellinfiltrate sichtbar.

Um die Kolitis weitergehend zu charakterisieren, wurde eine durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen durchgeführt (siehe Abbildung 3.16). Nach DSS-Gabe zeigte sich eine signifikante Erhöhung von Frequenz sowie absoluter Anzahl aller untersuchten T-Zell-Populationen. Die deutlichste Erhöhung nach DSS-Behandlung lag für die Frequenzen von *Foxp3*⁺- und *IFN-γ*⁺-T-Zellen vor. Die regulatorischen T-Zellen stiegen auf 17,2% (Kon-

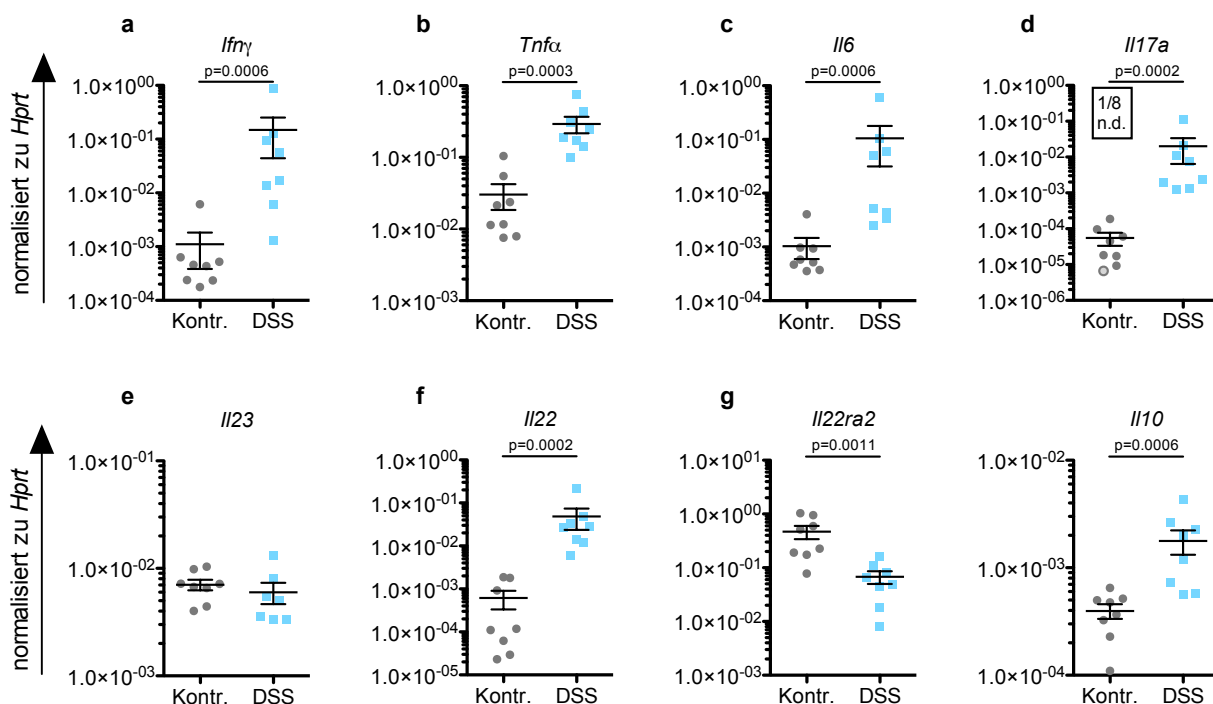


Abbildung 3.17: Expressionsmuster pro- und antiinflammatorischer Zytokine in Dickdarmgewebe auf mRNA-Ebene nach chronischer DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-}-Mäusen. Die gezeigten Werte wurden normalisiert zu Hprt. nd= nicht detektierbar, für diese Proben wurde der Ct-Wert auf 40 gesetzt, sie sind jeweils als hellgrau gefüllte Symbole dargestellt. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt Ergebnisse aus 1 Teilversuch, diese ließen sich in 2 weiteren Teilversuchen bestätigen.

trollgruppe: 12,6%, p=0,0064), die IFN- γ ⁺-T-Zellen auf 10,6% (Kontrollgruppe: 6,2%; p=0,0154). Da die Frequenzen aus unterschiedlichen Gating-Stufen stammen (siehe Abbildung 2.3), sind die absoluten Frequenz-Werte zwischen diesen beiden Populationen nicht direkt zu vergleichen.

Die weitergehende Charakterisierung der Zytokin-Expression auf mRNA-Ebene ist in Abbildung 3.17 zusammengefasst. Nach DSS-Behandlung zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Expressionslevel von *Ifn γ* , *Tnf α* , *Il6*, *Il17a*, *Il22* sowie *Il10*. Keine Änderung lag für *Il23* vor, die Expression von *Il22ra2* zeigte eine signifikante Verminderung nach DSS-Behandlung.

Zusammenfassend rief die Behandlung der *Mdr2*^{-/-}-Mäuse mit 2,5% DSS eine mittelgradige Kolitis hervor, die Ergebnisse bezüglich Gewichtsverlauf, Kolitis-Score und Kolonlänge sind vergleichbar mit denen der chronischen DSS-Kolitis in C57Bl/6-Mäusen. Auch die Veränderungen der intestinalen T-Zellen sind mit der Zunahme aller T-Zell-Populationen bezüglich Frequenz und absoluter Zellzahl ähnlich. Allerdings scheint die Zunahme der

Foxp3⁺-T-Zellen in den *Mdr2*^{-/-}-Tiere auf einem leicht erhöhten Niveau stattzufinden: Hier lagen die Frequenz in den Kontrolltieren bei 12,6% und erhöhte sich auf 17,2% nach DSS-Behandlung (C57Bl/6: Kontrollgruppe: 5,7%; DSS-Gruppe:12,6%). Die mRNA-Expression im Kolongewebe zeigte sehr ähnliche Expressionsmuster der analysierten Gene im Vergleich zwischen den C57Bl/6-Wildtypen und den *Mdr2*^{-/-}-Mäusen.

Im Folgenden wurde der Effekt der Kolitis auf die bereits bestehende Leberpathologie untersucht, welche die *Mdr2*^{-/-}-Tiere als Folge des gestörten Gallentransports entwickeln. Die zuvor ausgewerteten Parameter wurden um eine histologische Untersuchung der Leberfibrose erweitert, welche durch die fehlende *Mdr2*-Funktion entsteht. Die Basisparameter sind in Abbildung 3.18 gezeigt.

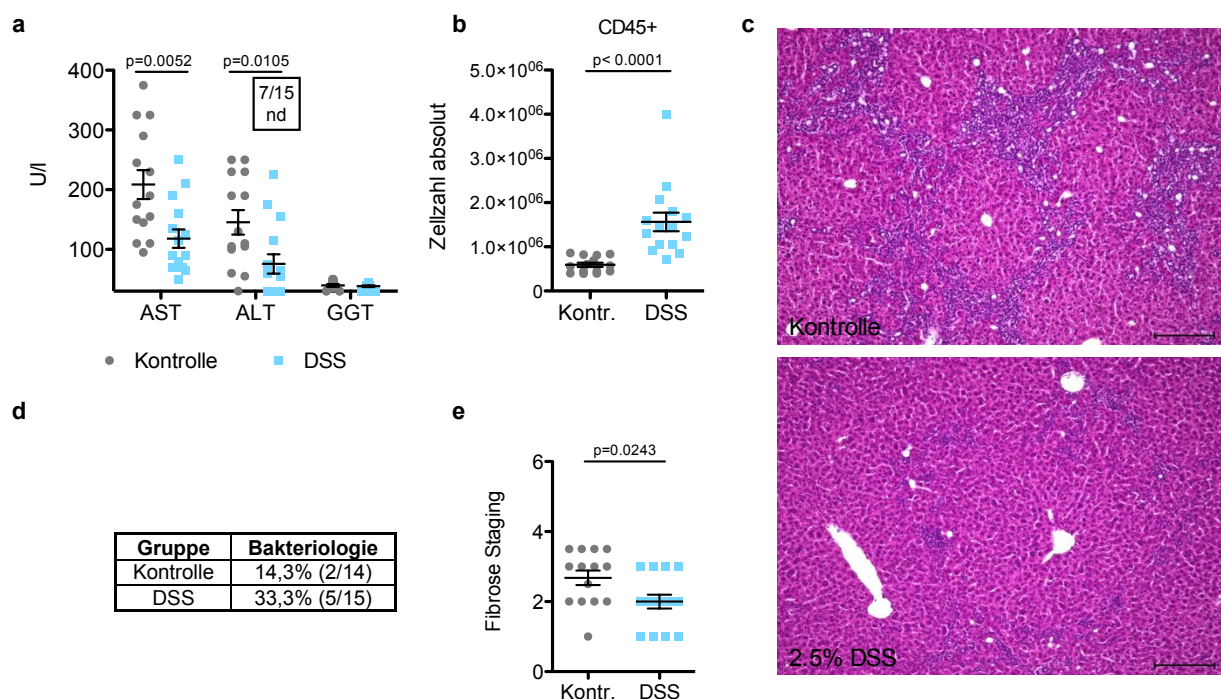


Abbildung 3.18: Quantifizierung der Leberpathologie bei chronischer DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-}-Mäusen. **a)** Serum-Level für AST, ALT und GGT, die untere Nachweisgrenze für ALT lag bei 30 U/l; nd= nicht detektierbar, für diese Werte wurde das untere Detektionslimit angenommen **b)** absolute Anzahl hepatischer CD45⁺-Zellen **c)** exemplarische HE-Übersicht 10x vergrößert, Maßbalken: 200 μm **d)** Anteil der Tiere mit mindestens einem positivem Bakteriennachweis aus Kultur oder PCR. **e)** histologische Quantifizierung der Leberfibrose. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 3 Teilversuchen.

Die Anzahl der CD45⁺-Zellen zeigte sich nach DSS-Behandlung wie in den vorhergehenden Versuchen erhöht (siehe Abbildung 3.18b; $p < 0,0001$). Mindestens ein positives Ergebnis aus den verschiedenen Nachweisen für Bakterien im Lebergewebe lag in der

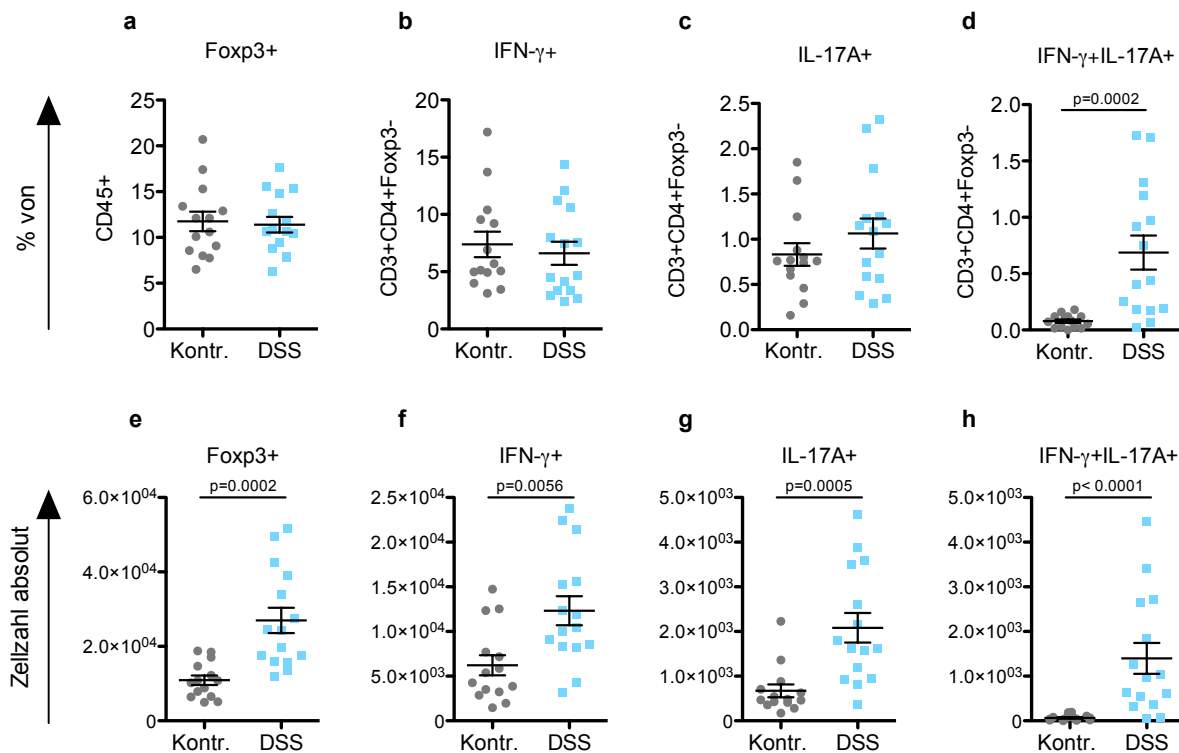


Abbildung 3.19: Durchflusszytometrische Charakterisierung der hepatischen T-Zellen bei chronischer DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-}-Mäusen. **a)-d)** Frequenz von *Foxp3*⁺-, *IFN-γ*⁺-, *IL-17A*⁺- sowie *IFN-γ*⁺*IL-17A*⁺-T-Zellen **e)-h)** absolute Zellzahl von *Foxp3*⁺-, *IFN-γ*⁺-, *IL-17A*⁺- sowie *IFN-γ*⁺*IL-17A*⁺-T-Zellen. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 3 Teilversuchen.

Kontrollgruppe für 2 von 14 (14,3%), in der DSS-Gruppe für 5 von 15 (33,3%) Tieren vor. Die Leberwerte zeigten eine Veränderung von ALT und AST, für die GGT war kein Unterschied zwischen den Gruppen nachweisbar. Entgegen der Annahme, dass die DSS-Kolitis und die damit einhergehende Vermehrung der Immunzellen in der Leber den vorbestehenden Leberschaden verstärken würde, zeigte sich ein umgekehrter Effekt: Die AST-Werte lagen in der DSS-Gruppe im Mittel bei 76 U/l, in der Kontrollgruppe bei 145 U/l ($p=0,0052$). Die ALT-Werte lagen in der Kontrollgruppe bei 207 U/l, nach DSS-Gabe bei durchschnittlich 118 U/l ($p=0,0105$). Eine singuläre AST-Erhöhung ist nicht spezifisch für einen Leberschaden, erst bei einer gleichzeitigen Erhöhung der ALT ist von einer Leberschädigung auszugehen [143].

Die niedrigeren Werte beider Enzyme nach DSS-Behandlung sprechen für eine Abmilderung des durch den Knockout hervorgerufenen Leberschadens. Dies zeigte sich auch im histologischen Fibrose-Score als Teil des mHAI: Die DSS-behandelten *Mdr2*^{-/-}-Mäuse wiesen im Mittel einen Wert von 2,0 auf, die Kontrolltiere einen von 2,67 ($p=0,0243$). Beispielhafte histologische Schnitte sind in Abbildung 3.18 c gezeigt.

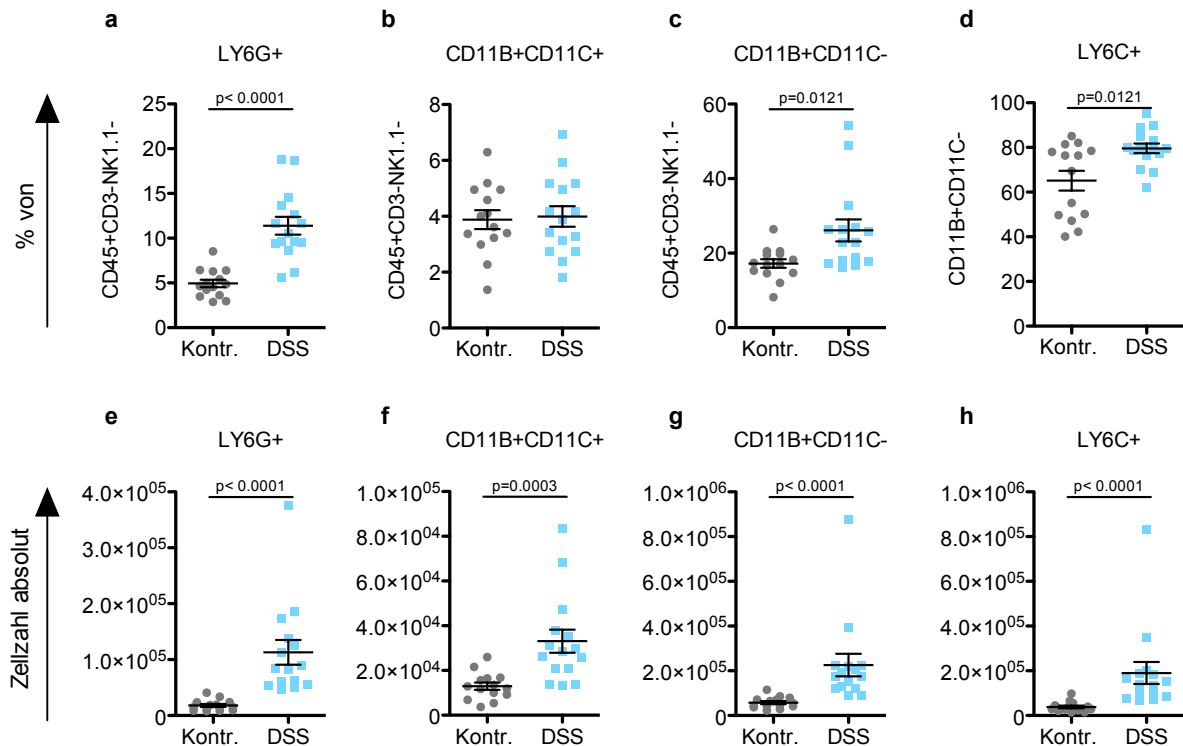


Abbildung 3.20: FACS-Analyse hepatischer Zellen des angeborenen Immunsystems bei chronischer DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-}-Mäusen. **a-c)** Frequenz von *LY6G*⁺-, *CD11B*⁺ *CD11C*⁺-, *CD11B*⁺ *CD11C*⁻- sowie *LY6C*⁺-Zellen **d-f)** absolute Anzahl von *LY6G*⁺-, *CD11B*⁺ *CD11C*⁺-, *CD11B*⁺ *CD11C*⁻- sowie *LY6C*⁺-Zellen. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 3 Teilversuchen.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung des Lebergewebes sind in Abbildung 3.19 zusammengefasst. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Frequenz der *IFN-γ*⁺*IL-17A*⁺-T-Zellen ($p=0,0002$). Die anderen T-Zell-Populationen zeigten keinen Unterschied in der Frequenz. Jedoch befanden sich die regulatorischen T-Zellen mit 11,8% in der Kontrollgruppe beziehungsweise 11,4% in der Behandlungsgruppe auf einem höheren Niveau als in den vorhergehenden Versuchen in C57Bl/6-Tieren nach DSS-Gabe (Frequenz *Foxp3*⁺-Zellen in der DSS-Gruppe: 6,1% nach akuter Kolitis; 8,8% nach chronischer Kolitis).

Die Übersicht der weiteren FACS-Analyse ist in Abbildung 3.20 dargestellt. Signifikant erhöhte Frequenzen sowie absolute Zellzahlen nach DSS-Behandlung lagen für *LY6G*⁺- sowie *LY6C*⁺-Zellen vor, zusätzlich zeigten sich signifikant erhöhte Werte der absoluten Zellzahlen für *CD11B*⁺*CD11C*⁻- sowie *CD11B*⁺*CD11C*⁺-Zellen.

Zudem erfolgte die Untersuchung der Gen-Expressionslevel für verschiedene pro- und anti-inflammatorische Zytokine im Lebergewebe analog zu den Vorversuchen (siehe Abbildung 3.21). Eine signifikante Erhöhung des Expressionslevels nach DSS-Behandlung war für *Il10*

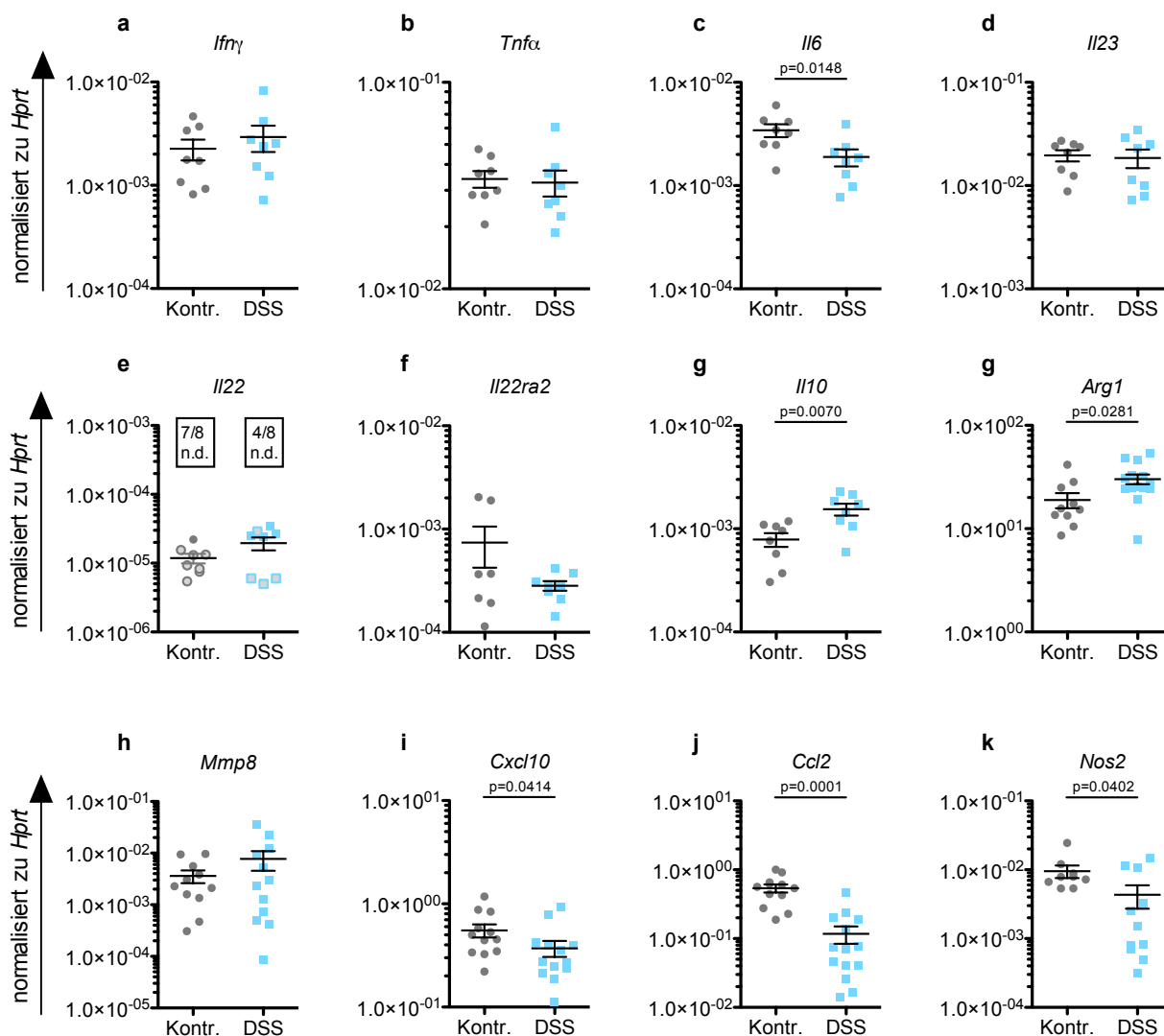


Abbildung 3.21: Expressionsmuster pro- und antiinflammatorischer Zytokine in Lebergewebe auf mRNA-Ebene nach chronischer DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-}-Mäusen. Die gezeigten Werte wurden normalisiert zu *Hprt*. nd= nicht detektierbar, für diese Proben wurde der Ct-Wert auf 40 gesetzt, sie sind jeweils als grau gefüllte Symbole dargestellt. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt Ergebnisse aus 1 Teilversuch, diese ließen sich in 2 weiteren Teilversuchen bestätigen.

sowie *Arg1* nachweisbar, die Expression von *Il6*, *Cxcl10*, *Ccl2* sowie *Nos2* hingegen war erniedrigt. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich der Expressionslevel von *Ifnγ*, *Tnfα*, *Il17a*, *Il23*, *Il22*, *Il22ra2* sowie *Mmp8*.

Da schon in der histologischen Untersuchung Fibrose nachzuweisen war, wurde das Panel an zu untersuchenden Genen um einige fibrosespezifischen Gene erweitert. Die Expression der Fibrose-Marker zeigte kein einheitliches Bild zwischen den durchgeführten Teilversuchen, weswegen diese in Abbildung 3.22 separat aufgeführt sind.

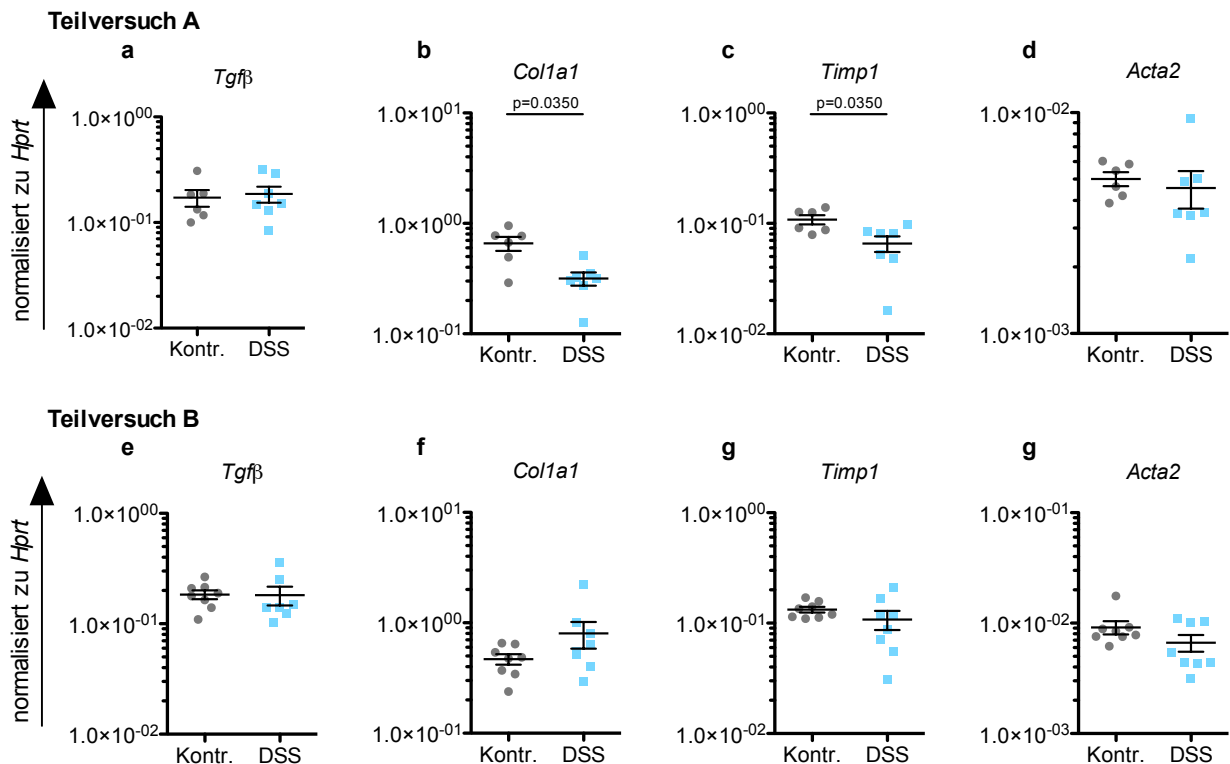


Abbildung 3.22: Expression von Fibrose-Markern in Lebergewebe auf mRNA-Ebene nach chronischer DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-}-Mäusen. **a-d)** Daten aus Teilversuch A. **e-h)** Daten aus Teilversuch B. Die gezeigten Werte wurden normalisiert zu *Hprt*. nd= nicht detektierbar, für diese Proben wurde der Ct-Wert auf 40 gesetzt, sie sind jeweils als grau gefüllte Symbole dargestellt. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt Daten aus Teilversuch A und B, da diese keine übereinstimmenden Ergebnisse zeigten.

Für Teilversuch A zeigten sich signifikant erniedrigte Expressionslevel von *Col1a1* und *Timp1* nach DSS-Gabe, kein Unterschied lag für *Tgfβ* und *Acta2* vor. Im Teilversuch B wurden diese Ergebnisse nicht bestätigt, es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen für die analysierten Gene.

Der Vergleich der Ergebnisse der DSS-Kolitis zwischen C57Bl/6 und *Mdr2*^{-/-}-Mäusen zeigt für beide Genotypen einen Anstieg der hepatischen CD45⁺-Zellen durch die chronische Kolitis. Zudem waren für beide Genotypen nach DSS-Gabe die Frequenzen von IFN- γ ⁺IL-17A⁺-, LY6G⁺- sowie LY6C⁺-Zellen im Lebergewebe erhöht. Allerdings fand diese Erhöhung in *Mdr2*^{-/-}-Mäusen auf einem niedrigeren Niveau statt (Kontrollgruppe:DSS-Gruppe in C57Bl/6-Tieren 10,8%:25,0%; in *Mdr2*^{-/-}-Tieren 4,9%:11,4%). Die absolute Zellzahl stieg unabhängig vom Genotyp für fast alle untersuchten Zellpopulationen nach DSS-Behandlung. Die Frequenz an hepatischen Foxp3⁺-T-Zellen war nur in C57Bl/6 Tieren nach DSS-Gabe auf im Mittel 8,8% (Kontrollgruppe: 6,4%) erhöht, für die *Mdr2*^{-/-}-

Tiere zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen, insgesamt aber eine höhere Frequenz: diese lag bei 11,4% für die DSS-behandelten und 11,8% für die unbehandelten *Mdr2*^{-/-}-Tiere. Zu beachten ist, dass diese Ergebnisse in voneinander unabhängigen Versuchen erhoben wurden und daher nicht uneingeschränkt miteinander verglichen werden können. Auf RNA-Ebene zeigten sich im Lebergewebe für mehrere Gene diametrale Ergebnisse: während die Expressionslevel von *Il6* und *Ccl2* in C57Bl/6-Tieren nach DSS-Gabe signifikant erhöht war, zeigten sie sich in den *Mdr2*^{-/-}-Mäusen nach DSS-Gabe erniedrigt. Die Level von *Cxcl10* sowie *Nos2* zeigten in C56Bl/6-Mäusen nach DSS-Behandlung keinen signifikanten Unterschied mit einem Trend zur Erhöhung, während sie in den *Mdr2*^{-/-}-Tieren nach DSS-Gabe signifikant erniedrigt waren (siehe Abbildung 3.14 sowie Abbildung 3.21).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die erwartete stärkere Erkrankung der Versuchstiere durch die Kombination der zwei Krankheitsmodelle nicht eintrat. Es zeigte sich vielmehr eine Tendenz zur Verbesserung der durch den *Mdr2*^{-/-}-Knockout hervorgerufenen Leberschädigung, wie sich anhand der niedrigeren Leberenzyme im Serum sowie der geringer ausgeprägten Fibrose zeigte.

3.4 Kolitis nach adoptiven T-Zell-Transfer

Im Verlauf der DSS-Kolitis wird das DSS nicht nur lokal im Intestinaltrakt aufgenommen, sondern verteilt sich auch in weiteren Organen, wie beispielsweise mesenterialen Lymphknoten, Milz und insbesondere auch der Leber [123]. Um zu ermitteln, welche der bisher beschriebenen Effekte auf eine Kolitis zurückzuführen sind und unabhängig von einer DSS-Gabe auftreten, wurde eine Kolitis durch den adoptiven Zelltransfer *in vitro* differenzierter T-Zellen in *Rag1*^{-/-}-Mäusen induziert. Dazu wurden nach *in vitro* Differenzierung IL-17A⁺- oder IFN- γ ⁺-T-Zellen transferiert; Kontrolltiere erhielten nur PBS (siehe Kapitel 2.3). Die Tiere der verschiedenen Versuchsgruppen wurden miteinander gemischt gehalten. Einmal wöchentlich wurde das Gewicht bestimmt und ab der 3. Woche wurde zusätzlich der endoskopische Kolitis-Score verblindet erhoben. 6 Wochen nach Transfer wurden die Tiere getötet und Kolitis sowie Leberschädigung evaluiert.

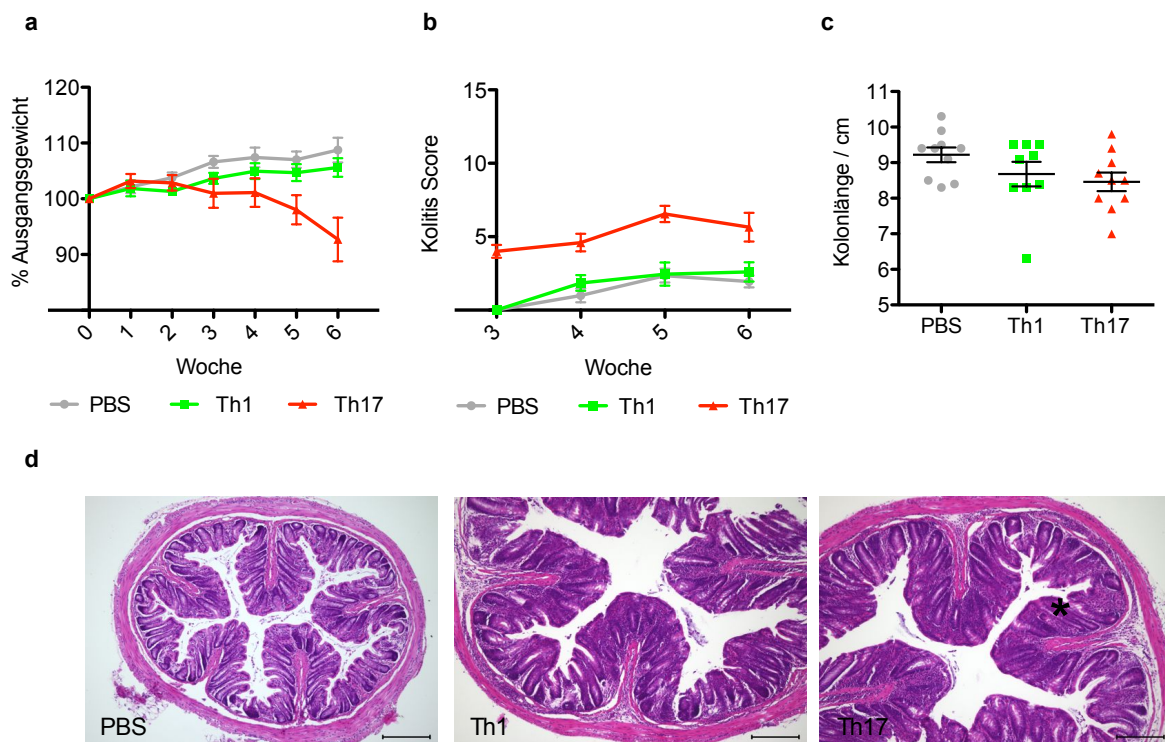


Abbildung 3.23: Erkrankungsschwere und Dickdarmentzündung bei Transfer-Kolitis. **a)** gemitteltes prozentuales Gewicht im Verhältnis zu Tag 0 **b)** endoskopischer Kolitis-Score. **c)** Kolonlänge **d)** exemplarische HE-Übersicht jeder Behandlungsgruppe bei 10x Vergrößerung, der Stern markiert einen Granulozyten, Maßbalken: 200 μ m. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier ($n=30$, jeweils 10 Tiere pro Gruppe). Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 2 Teilversuchen. PBS: Kontrollgruppe nach PBS-Injektion; Th1: Transfer von IFN- γ ⁺-T-Zellen; Th17: Transfer von IL-17A⁺-T-Zellen.

Die Entwicklung der Kolitis wurde anhand mehrerer Parameter überwacht, wie in Abbildung 3.23 dargestellt. Als globaler Erkrankungsmarker diente das Gewicht im Verhältnis zum Ausgangsgewicht zu Beginn des Experiments. Hier zeigten die Tiere der Kontroll-Gruppe und nach Th1-Injektion nach 6 Wochen eine Gewichtszunahme (PBS: durchschnittlich 109%, Th1: 106%), nach dem Transfer von Th17-Zellen kam es zu einer durchschnittlichen Gewichtsabnahme auf 93% des Ausgangsgewichtes. Der endoskopische Kolitis-Score zeigte keinen Unterschied zwischen PBS- und Th1-behandelten Mäusen (PBS: 1,95 Pkt; Th1: 2,6 Pkt.), nach Th17-Transfer entwickelte sich eine milde Kolitis (5,65 Pkt.).

Die Kolonlänge zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Nach Th17-Transfer lag ein Trend zur Verkürzung vor: In der Kontrollgruppe lag die mittlere Kolonlänge bei 9,2 cm, nach Th17-Transfer bei im Mittel 8,4 cm ($p=0,0574$). Repräsentative HE-gefärbte histologische Schnitte sind in Abbildung 3.23 d gezeigt. Im Unterschied zur Kolitis nach DSS-Gabe zeigten sich weder Ulzerationen noch ein Verlust der Dickdarmfältelung.

Um die Kolitis weitergehend zu charakterisieren, erfolgte eine FACS-Analyse der intestinalen T-Zellen, wie in Abbildung 3.24 dargestellt. Die Gesamtzellzahl wies in den einzelnen Gruppen eine hohe Variabilität auf, die Gruppen unterschieden sich nicht signifikant. Jedoch zeigten die beiden Behandlungsgruppen einen ähnlichen Trend zu höheren Mittelwerten als die Kontrollgruppe. Die Analyse der CD45.1⁺-Zellen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen; auf Grund eines technischen Fehlers wurden nur 2 der Proben aus der Kontrollgruppe analysiert.

Da die transferierten T-Zellen aus Reporter-Mäusen für IL-17 und IFN- γ stammten, konnte die Analyse sowohl direkt nach Isolation der Zellen ohne weitere Stimulation als auch nach unspezifischer Restimulation mit PMA/Ionomycin (siehe 2.7) erfolgen. *Rag1*^{-/-}- Mäuse besitzen keine T-Zellen, weswegen für das adaptive Immunsystem nur die Th1- und Th17-Gruppe verglichen wurden.

Im Folgenden sind lediglich die Frequenzen der einzelnen T-Zell-Subtypen gezeigt. Die absoluten Zellzahlen ergeben sich aus dem Verhältnis von absolut isolierten Zellen und den Frequenzen, sie sind nicht gesondert dargestellt.

Statistisch signifikante Unterschiede lagen ohne Stimulation für die Frequenzen von IFN- γ ⁺-T-Zellen ($p=0,0004$) sowie IL-17A⁺-T-Zellen ($p=0,0036$) vor: beide T-Zell-Subtypen zeigten im Kolongewebe nach Th17-Transfer eine höhere Frequenz als nach Th1-Transfer (siehe 3.24 d, e). Nach Restimulation stiegen die Frequenzen der jeweiligen T-Zellen, ein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen war allerdings nur noch für die IL-17A⁺-Zellen ($p= 0,0068$) nachweisbar.

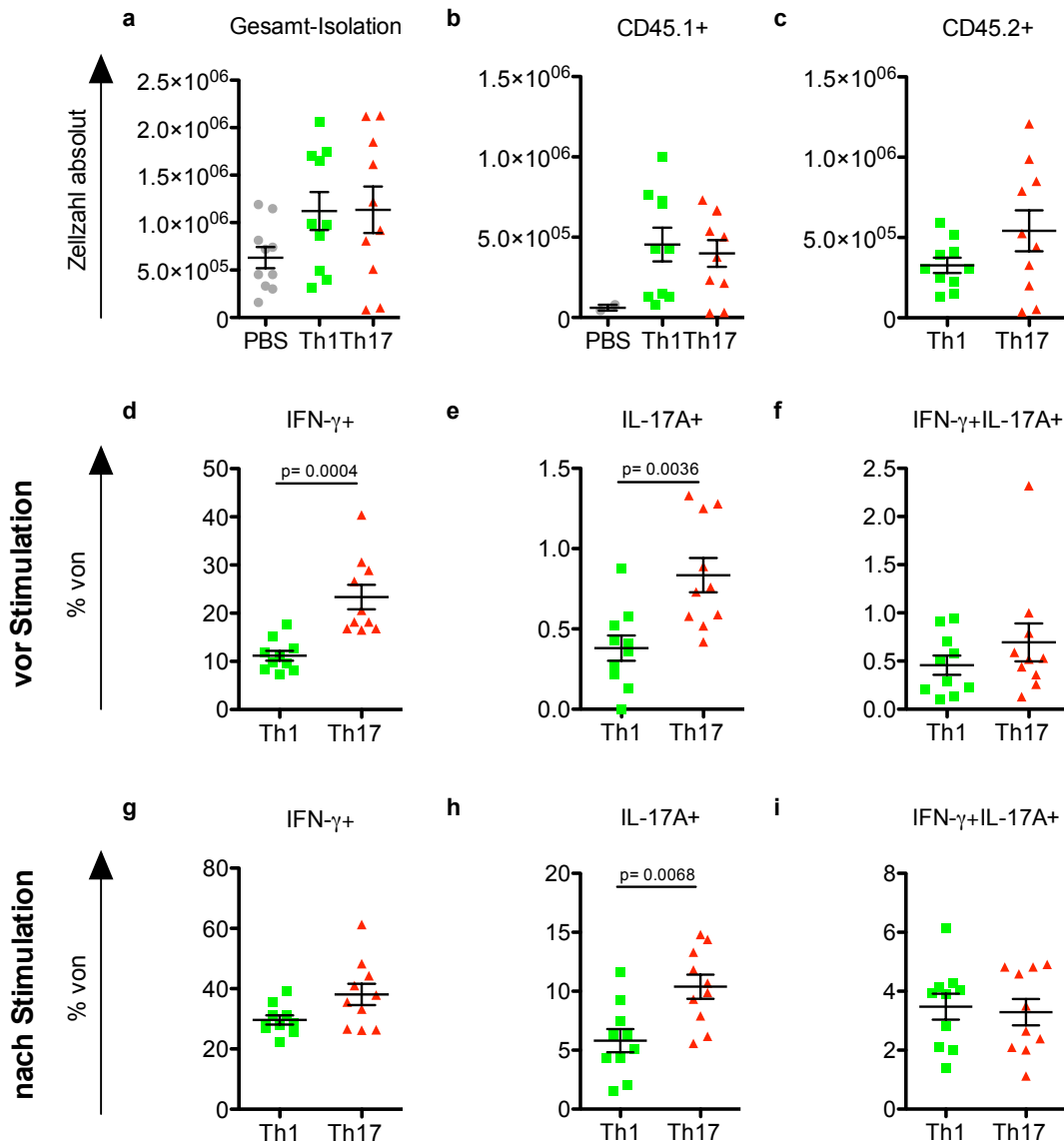


Abbildung 3.24: FACS-Analyse intestinaler T-Zellen nach Transfer von IFN- γ^+ T-Zellen beziehungsweise IL-17A⁺-T-Zellen. **a)** absolute Anzahl isolierter Zellen aus dem Kolongewebe **b)** absolute Anzahl CD45.1⁺-Zellen (Immunzellen der Empfänger-Maus) **c)** absolute Anzahl CD45.2⁺-Zellen (Transferierte T-Zellen) **d-f)** Prozentualer Anteil von IFN- γ^+ -, IL-17A⁺- sowie IFN- γ^+ IL-17A⁺-T-Zellen vor Stimulation **g-i)** Prozentualer Anteil von IFN- γ^+ -, IL-17A⁺- sowie IFN- γ^+ IL-17A⁺-T-Zellen nach Restimulation. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier ($n=30$, jeweils 10 Tiere pro Gruppe). Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 2 Teilversuchen. PBS: Kontrollgruppe nach PBS-Injektion; Th1: Transfer von IFN- γ^+ -T-Zellen; Th17: Transfer von IL-17A⁺-T-Zellen.

Die Analyse der Ergebnisse auf mRNA-Ebene ist in Abbildung 3.25 gezeigt. Signifikant höhere Expressionslevel im Vergleich zu der Kontrollgruppe lagen nach Th17-Transfer für *Ifn γ* , *Il22* sowie *Tnf α* vor. Kein Unterschied zeigte sich für *Il6*, *Il17*, *Il23* sowie *Il22ra2*.

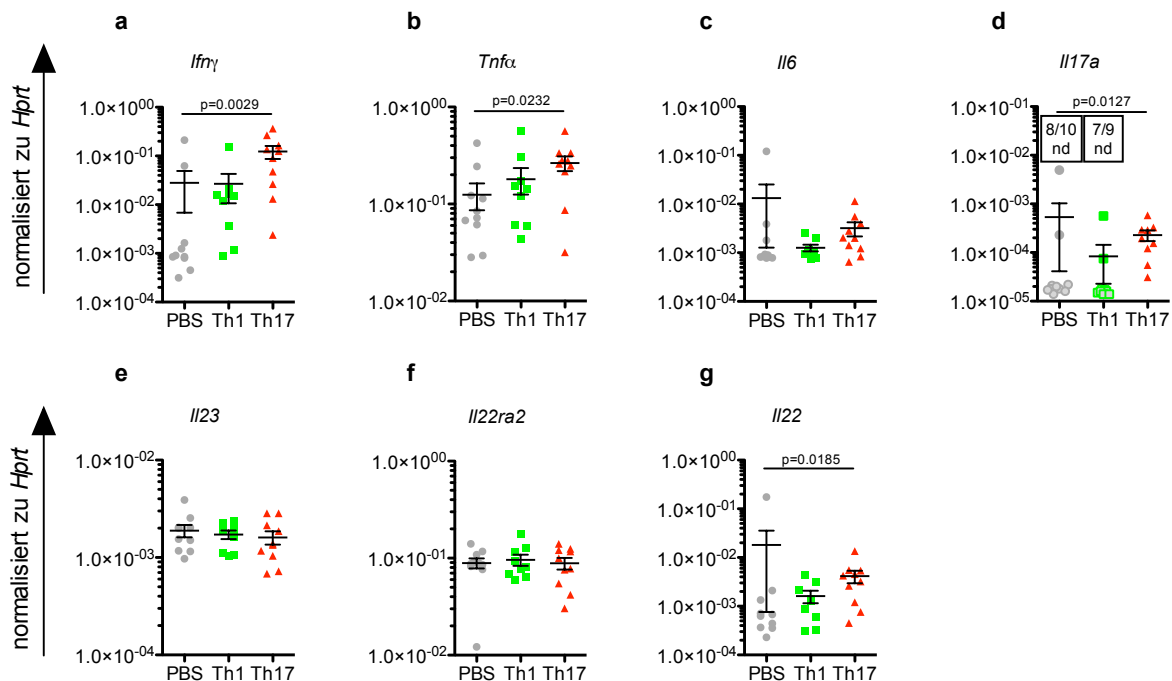


Abbildung 3.25: Expressionsmuster proinflammatorischer Zytokine in Kolongewebe auf mRNA-Ebene in Woche 6 nach Zell-Transfer. Die gezeigten Werte wurden normalisiert zu *Hprt*. nd= nicht detektierbar, für diese Proben wurde der Ct-Wert auf 40 gesetzt, sie sind jeweils als grau gefüllte Symbole dargestellt. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 2 Teilversuchen. PBS: Kontrollgruppe nach PBS-Injektion; Th1: Transfer von $IFN-\gamma^+$ T-Zellen; Th17: Transfer von $IL-17A^+$ T-Zellen.

Zusammenfassend ließ sich durch Transfer von *in vitro* differenzierten Th17-Zellen eine milde Kolitis hervorrufen. Die *in vitro* differenzierten Zellen wiesen unabhängig von ihrer Zytokin-Produktion zum Zeitpunkt des Transfers 6 Wochen nach Beginn des Experiments im Kolongewebe überwiegend eine Produktion von $IFN-\gamma$ auf. Hierbei zeigten sich für $IFN-\gamma^+$ - sowie $IL-17A^+$ -T-Zellen nach Transfer von Th17-Zellen höhere Frequenzen als nach Transfer von Th1 Zellen. Dabei produzierte nur ein Teil der transferierten Zellen mit der Fähigkeit zur Produktion von $IFN-\gamma$ beziehungsweise $IL-17A$ zum Zeitpunkt der Isolation die beiden Zytokine, wie sich anhand der gesteigerten Frequenzen für alle analysierten T-Zell-Subpopulationen nach unspezifischer Stimulation zeigte.

Leberpathologie nach T-Zell-Transfer

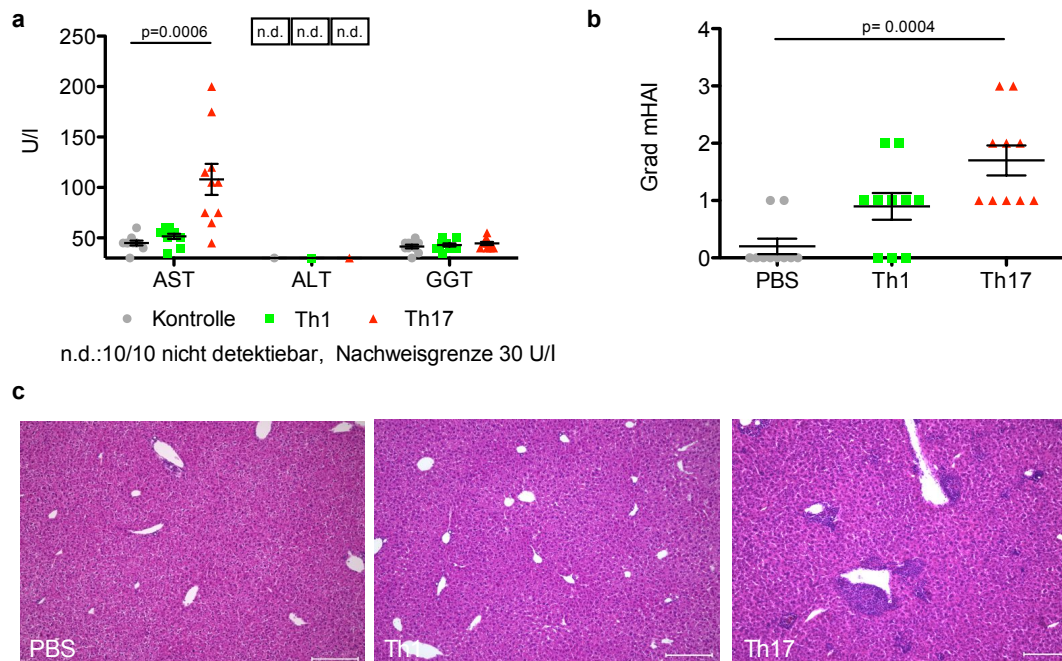


Abbildung 3.26: Quantifizierung der Leberpathologie nach Transfer-Kolitis **a)** Serum-Level für AST, ALT und GGT, die untere Nachweisgrenze für die ALT lag bei 30 U/l; nd= nicht detektierbar **b)** Histologisch nachweisbarer Grad der Leberschädigung **c)** exemplarische HE-Übersichten der Leber, 10x vergrößert, Maßbalken: 200 µm. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier (n=30, jeweils 10 Tiere pro Gruppe). Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 2 Teilversuchen.

Die Analyse der Leberveränderung erfolgte analog zu den Vorversuchen. In Abbildung 3.26 sind die Basisparameter zusammengefasst. Die AST zeigte sich nach Th17-Transfer im Mittel auf 108 U/l signifikant erhöht ($p=0,0006$; PBS: 45 U/l; Th1:51,5 U/l), für ALT und GGT lag kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen vor (siehe Abbildung 3.26 a). Da die AST nicht leberspezifisch ist, sondern in verschiedenen Organen exprimiert wird, kann keine Aussage über die Art der geschädigten Zellen gemacht werden [143]. In der histologischen Untersuchung fand sich eine signifikante Erhöhung des mHAI-Grads im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Th17-Transfer ($p=0,0004$) nicht jedoch nach Th1-Transfer.

Infiltrate durch Immunzellen fanden sich sowohl assoziiert zu den Gallengängen, als auch innerhalb der Leberläppchen (repräsentative Histologie siehe Abbildung 3.26c). Eine Fibrosierung wurde nicht beobachtet.

Die weitere Charakterisierung der hepatischen Immunzellen ist in den Abbildungen 3.27 und 3.28 dargestellt. Die histologisch sichtbare vermehrte Infiltration durch Immunzellen ließ sich durchflusszytometrisch bestätigen: Nach Th17-Transfer zeigte sich sowohl die

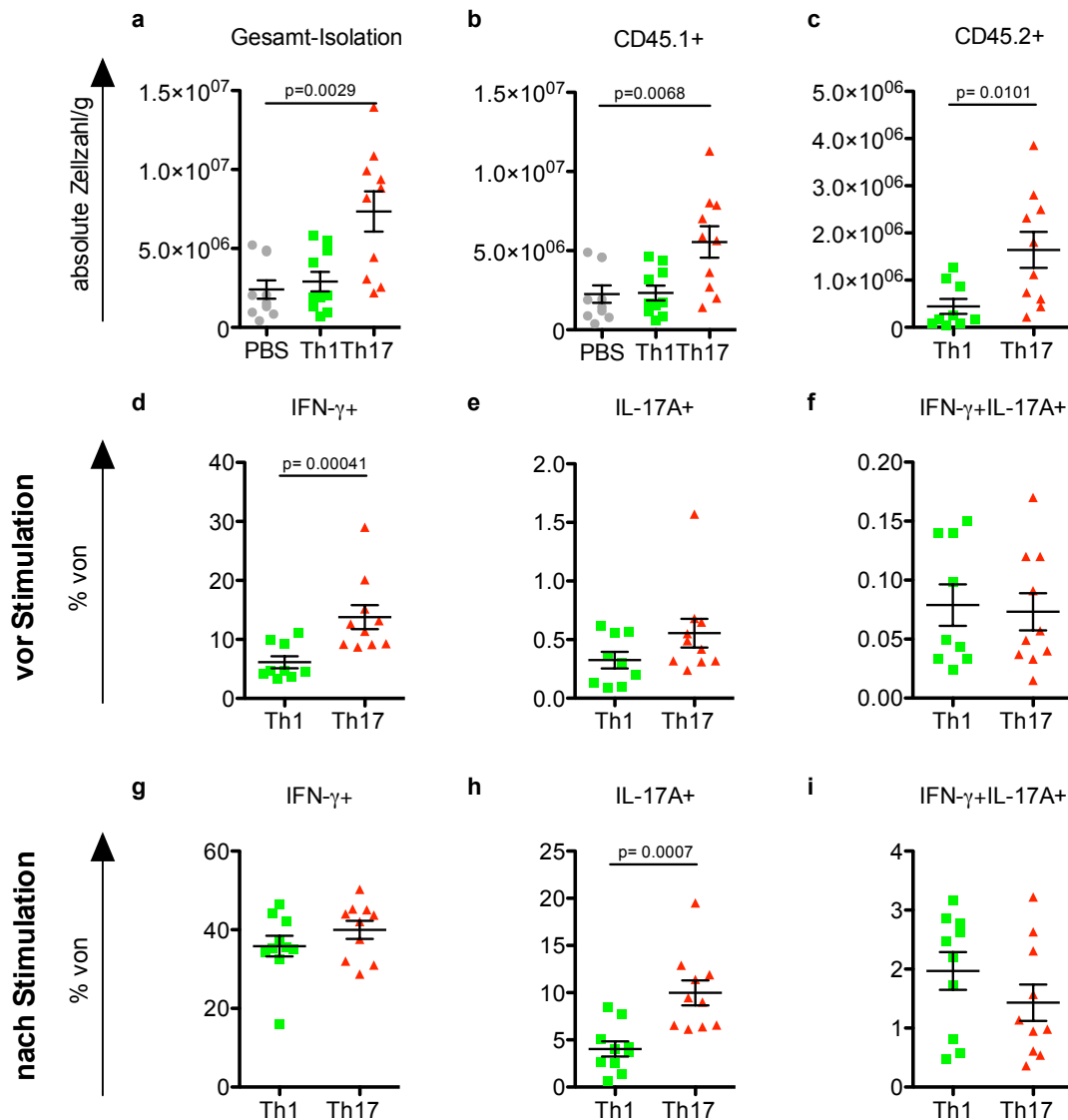


Abbildung 3.27: FACS-Analyse hepatischer T-Zellen nach Transfer von IFN- γ ⁺-T-Zellen beziehungsweise IL-17A⁺-T-Zellen. **a)** absolute Anzahl isolierter Zellen aus dem Lebergewebe **b)** absolute Anzahl CD45.1⁺-Zellen (Immunzellen der Empfänger-Maus) **c)** absolute Anzahl CD45.2⁺-Zellen (Transferierte T-Zellen) **d-f)** Prozentualer Anteil von IFN- γ ⁺-, IL-17A⁺- sowie IFN- γ ⁺IL-17A⁺-T-Zellen vor Stimulation **g-i)** Prozentualer Anteil von IFN- γ ⁺-, IL-17A⁺- sowie IFN- γ ⁺IL-17A⁺-T-Zellen nach Restimulation. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier (n=30, jeweils 10 Tiere pro Gruppe). Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 2 Teilversuchen. PBS: Kontrollgruppe nach PBS-Injektion; Th1: Transfer von IFN- γ ⁺-T-Zellen; Th17: Transfer von IL-17A⁺-T-Zellen.

Anzahl der CD45.1⁺-Zellen (p=0,0068), also der Zellen des angeborenen Immunsystems, als auch die Anzahl der CD45.2⁺-Zellen (p=0,0101), also der transferierten T-Zellen, im Vergleich zur Kontrollgruppe und Th1-Transfer-Gruppe erhöht (siehe 3.27 b-c).

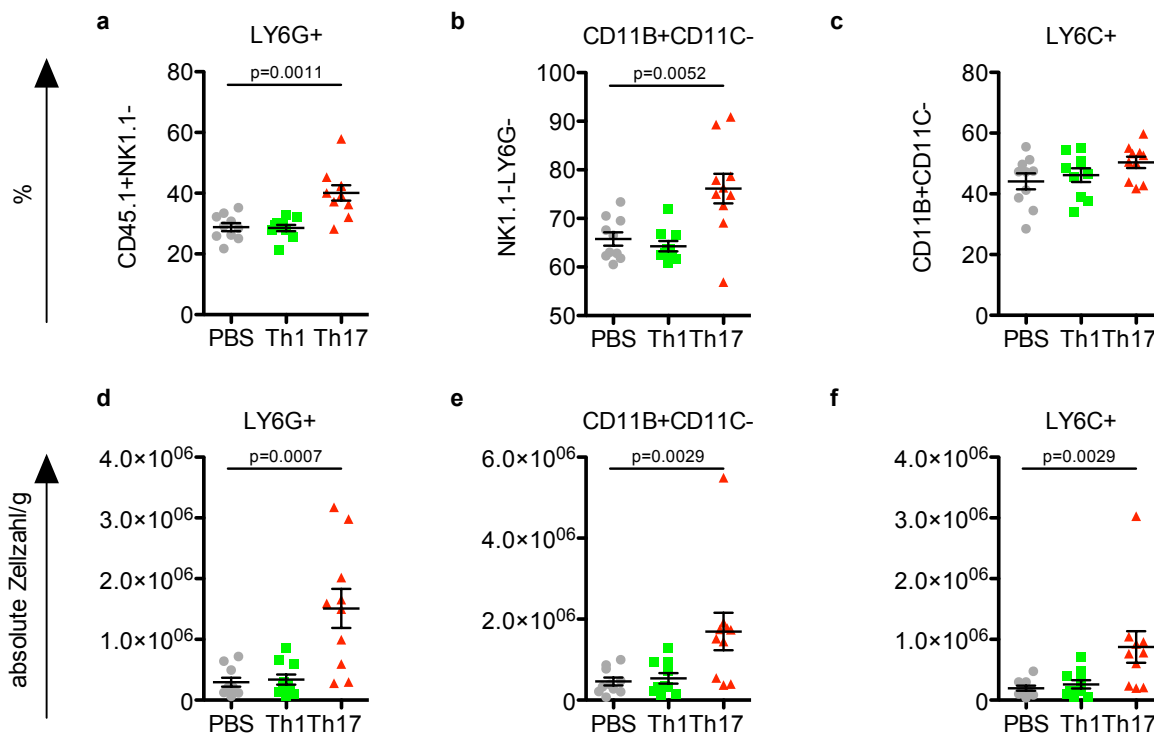


Abbildung 3.28: FACS-Analyse hepatischer Zellen des angeborenen Immunsystems nach Transfer von $\text{IFN-}\gamma^+$ T-Zellen beziehungsweise IL-17A^+ -T-Zellen. **a-c)** Frequenz von LY6G^+ -, $\text{CD11B}^+ \text{CD11C}^+$ -, $\text{CD11B}^+ \text{CD11C}^-$ - sowie LY6C^+ -Zellen **d-f)** absolute Anzahl von LY6G^+ -, $\text{CD11B}^+ \text{CD11C}^+$ -, $\text{CD11B}^+ \text{CD11C}^-$ - sowie LY6C^+ -Zellen. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier ($n=30$, jeweils 10 Tiere pro Gruppe). Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 2 Teilversuchen. PBS: Kontrollgruppe nach PBS-Injektion; Th1: Transfer von $\text{IFN-}\gamma^+$ T-Zellen; Th17: Transfer von IL-17A^+ -T-Zellen.

Statistisch signifikante Unterschiede lagen ohne Stimulation für die Frequenz von $\text{IFN-}\gamma^+$ -T-Zellen ($p=0,00041$) vor; dieser T-Zell-Subtyp zeigte im Lebergewebe nach Th17-Transfer eine höhere Frequenz als nach Th1-Transfer (siehe 3.27 d). Nach Restimulation stiegen die Frequenzen für alle Subtypen, ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen war noch für die IL-17A^+ -Zellen ($p= 0,0007$) nachweisbar (3.27 h). Die Analyse der extrazellulär gefärbten Leberzellen zeigte eine erhöhte Frequenz an LY6G^+ -sowie $\text{CD11B}^+ \text{CD11C}^-$ -Zellen nach Th17-Transfer, während sich Kontroll- und Th1-Gruppe bezüglich dieser Zellpopulationen nicht signifikant voneinander unterschieden. Für die LY6C^+ -Population lag kein signifikanter Unterschied der Frequenz zwischen den Gruppen vor (PBS: 44,13%; Th1:46,17%, Th17: 50,36%). Für die absoluten Zellzahlen zeigten sich alle analysierten Zellpopulationen nach Transfer von IL-17A^+ -Zellen erhöht, wie in Abbildung 3.28 d-f gezeigt.

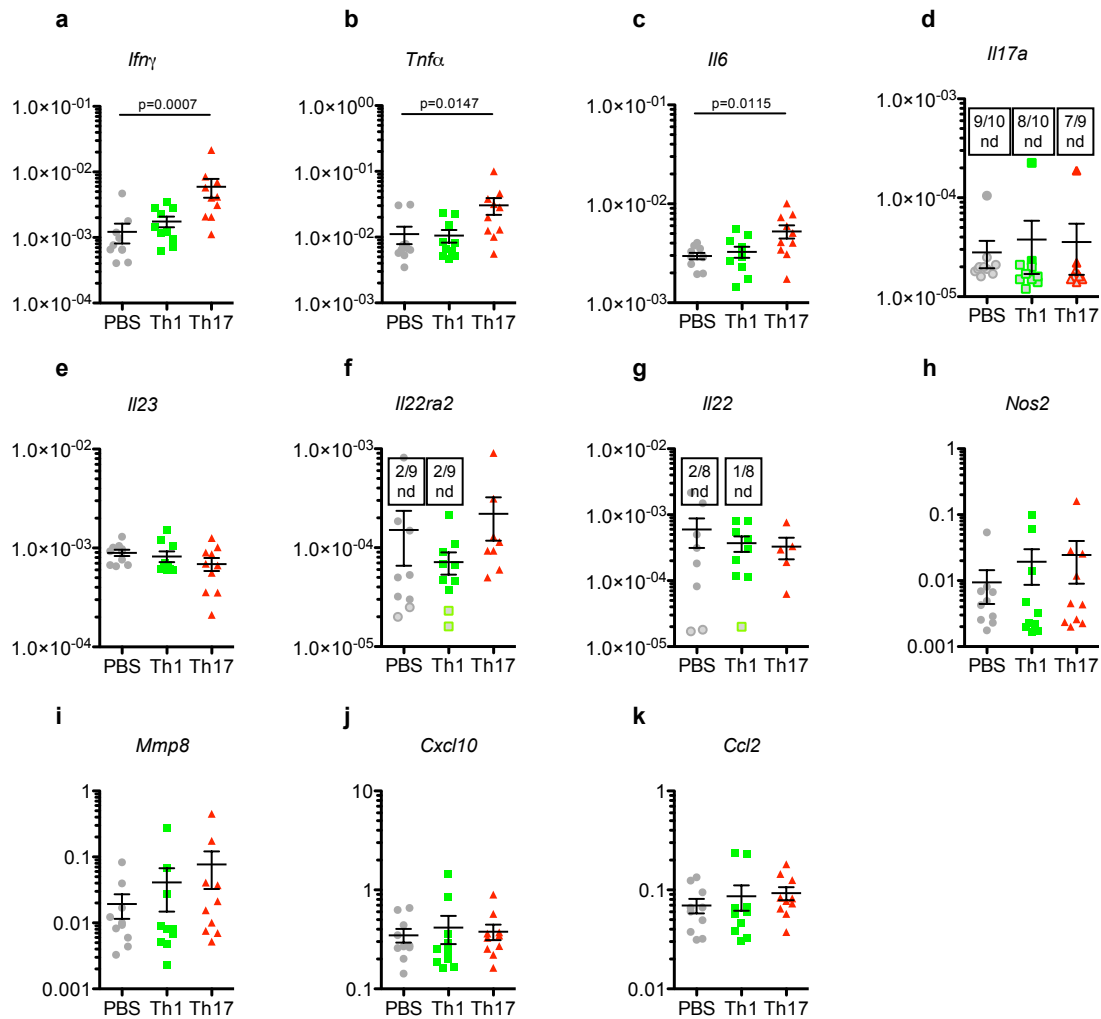


Abbildung 3.29: Expressionsmuster proinflammatorischer Zytokine des Lebergewebes auf mRNA-Ebene in Woche 6 nach Zell-Transfer. Die gezeigten Werte wurden normalisiert zu *Hprt*. nd= nicht detektierbar, für diese Proben wurde der Ct-Wert auf 40 gesetzt, sie sind jeweils als grau gefüllte Symbole dargestellt. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Die Grafik zeigt kumulative Ergebnisse aus 2 Teilversuchen. PBS: Kontrollgruppe nach PBS-Injektion; Th1: Transfer von $IFN-\gamma^+$ T-Zellen; Th17: Transfer von $IL-17A^+$ T-Zellen.

Auf mRNA-Ebene lagen signifikant höhere Expressionslevel nach Th17-Transfer für *Ifn γ* , *Tnf α* sowie *Il6* vor, während die Th1- und die Kontrollgruppe ähnliche Expressionslevel aufwiesen. Kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen zeigte sich für *Il17*, *Il23*, *Il22* sowie *Il22ra2*.

Zusammengefasst zeigte sich nach Th17-Transfer eine Hepatitis mit einer hepatischen Immunzellvermehrung und histologisch nachweisbaren Zellinfiltraten sowie angestiegenen AST-Werten. Zusätzlich bestand eine Erhöhung proinflammatorischer Zytokine auf RNA-Ebene. Eine Fibrosierung des Lebergewebes wurde nicht beobachtet.

4. Diskussion

4.1 Hepatische Akkumulation von Immunzellen durch Kolitis

In gesunden Wildtypen konnte sowohl nach akuter als auch nach chronischer DSS-Kolitis eine Zunahme der CD45⁺-Immunzellen in der Leber beobachtet werden. Nach der akuten DSS-Kolitis nahm die absolute Anzahl aller getesteten Subpopulationen zu, eine Zunahme der Frequenz war am deutlichsten für CD11B⁺LY6G⁻- und CD11B⁺LY6C⁺-Zellen. Nach chronischer DSS-Kolitis waren zusätzlich die Frequenzen von regulatorischen sowie IL-17A⁺- und IFN- γ ⁺IL-17A⁺-T-Zellen erhöht. Zudem zeigten sich im chronischen Modell in der histologischen Untersuchung unspezifische Zellinfiltrationen der Leber und es konnten häufiger als in der Kontrollgruppe Bakterien im Lebergewebe nachgewiesen werden. In der RNA-Analyse waren die Expressionslevel von *Tnf α* , *Il6* sowie *Ccl2* nach chronischer, nicht aber nach akuter DSS-Kolitis erhöht.

Vorarbeiten zu hepatischen Zellinfiltraten nach DSS-Kolitis decken jeweils nur einzelne Zellgruppen ab, weswegen in dieser Arbeit das Spektrum der analysierten Zellen erweitert werden sollte (siehe Kapitel 2.7). Die deutlichsten Veränderungen zeigten sich für die Frequenz von CD11B⁺LY6G⁻- sowie CD11B⁺LY6C⁺-Zellen, welche sich am ehesten neutrophilen Granulozyten beziehungsweise inflammatorischen Monozyten zuordnen lassen [135, 138]. Neutrophile Granulozyten sind elementarer Bestandteil des angeborenen Immunsystems und werden bei akuten Entzündungen als erste Immunzellen rekrutiert. Die Elimination von Pathogenen kann dabei über Phagozytose, Freisetzung von antibakteriellen Proteinen, wie Defensine und Lysozym, oder durch *Neutrophil extracellular Traps* (NETs) erfolgen [144, 145, 146]. Als Reaktion auf eine bakterielle Infektion werden Neutrophile schnell in die Leber rekrutiert und sind gemeinsam mit Monozyten und Makrophagen an der Abwehrreaktion beteiligt [147, 148]. Neutrophilen-depletierte Tiere hingegen zeigen eine gestörte Clearance verschiedener Bakterien aus dem Blutstrom durch die Leber [149]. Eine überschießende Aktivierung von Neutrophilen kann jedoch insbesondere in der Leber zu einer Exazerbation eines Gewebeschadens führen, wie Versuche zur Endotoxämie sowie alkoholischen, autoimmunen und viralen Hepatitiden zeigen [150]. In der hier vorliegenden Arbeit scheint eine solche Überaktivierung angesichts der unauffälligen laborchemischen und histologischen Ergebnisse nicht vorzuliegen.

Monozyten sind zirkulierende Vorläuferzellen von Makrophagen und DC. LY6C^{high}-Monozyten werden rasch zu Infektionsherden rekrutiert und können dort zu Makrophagen und TNF-produzierenden DC differenzieren [151, 152]. Aufgrund ihrer hohen Plastizität können sie – abhängig vom umgebenden Milieu – inflammatorische Reaktionen verstärken oder an der Heilung eines Gewebeschadens beteiligt sein [153, 154]. Beide Zelltypen könnten also entsprechend ihrer Abwehrfunktion gegen Bakterien an der Clearance von translozierten Bakterien nach Kolitis beteiligt sein.

Der Effekt einer DSS-Kolitis auf die primär gesunde Leber ist Gegenstand einiger Vorarbeiten: Einen ähnlichen zeitlichen Verlauf bezüglich des Zellinfiltrats zeigt eine vorhergehende Studie, in der die Gabe von 2,5%iger DSS-Lösung nicht nach 14, sondern erst nach 28 Tagen histologisch nachweisbare Veränderungen der Leber hervorruft. Zudem treten 1-3 Tage nach Beginn der Kolitis vermehrt hepatische NKT-Zellen, sowie im Verlauf eine Veränderung der T-Zell-Komposition mit gesteigerter Produktion von IFN- γ und IL-10 auf [126]. In weiteren Studien sind nach DSS-Kolitis zusätzlich vermehrt CD11B⁺CD11C⁻-Zellen sowie CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in der Leber nachweisbar [128, 155]. Dabei sind T-Zellen für die hepatischen Veränderungen wahrscheinlich initial nicht nötig, da die DSS-Exposition von *Rag2*^{-/-}-Tieren, welche keine T-Zellen exprimieren, ebenfalls zu einer Zunahme von CD11B⁺CD11C⁻-Zellen und einem veränderten APC-Gleichgewicht im Lebergewebe führt [155].

Zudem induzierte die Kolitis neben dem Zellinfiltrat ein proinflammatorisches Milieu in der Leber, wie sich anhand erhöhter RNA-Expressionslevel für *TNF α* , *Il6* und *Ccl2* zeigte (siehe Abbildung 3.14), was in zwei weiteren Arbeiten auf RNA- sowie Proteinebene bestätigt wird [155, 156]. Ein Teil der Zytokine gelangt dabei zusätzlich zur hepatischen Produktion über den portalvenösen Blutfluss aus dem Darm in die Leber, wie die Analyse von portalvenösem Blut nach DSS-Kolitis zeigt [128]. Diese Produktion scheint allerdings sekundär zu sein, so ist in keimfrei-gehaltenen Mäusen nach DSS-Kolitis ebenfalls eine deutliche Entzündung im Darmgewebe nachweisbar, dies führt allerdings zu keiner Immunzellinfiltration der Leber [155].

Insgesamt lag trotz nachgewiesener histologischer Veränderungen des Lebergewebes keine deutliche Erhöhung serologischer Marker als Hinweis auf eine schwerwiegende Gewebeschädigung vor (siehe 3.4, 3.11 sowie [155, 128]). Trivedi *et al.* wiesen zwar eine signifikante Transaminasenerhöhung durch DSS-Kolitis nach [156]. In Anbetracht des allerdings insgesamt niedrigen Levels sowie der geringen Differenz (Erhöhung AST: um circa 20 U/l, ALT: um circa 35 U/l) ist trotz statistisch signifikanter Zunahme von einem sehr mildem Leberzellschaden auszugehen. Allerdings scheint die DSS-Kolitis eine erhöhte Suszeptibilität der Leber zu verursachen, so zeigen DSS-behandelte Tiere deutlichere Leberschäden nach Belastung mittels Fas-aktivierendem Jo2-Antikörper [155].

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit – übereinstimmend mit den Ergebnissen vorhergehender Untersuchungen – durch eine DSS-Kolitis ein hepatisches Zellinfiltrat induziert werden. Zudem wurde die Charakterisierung der infiltrierenden Zellen erweitert. Die erhobenen Daten legen nahe, dass es nach akuter Kolitis primär zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems in der Leber kommt, während erst durch die chronische DSS-Gabe auch das adaptive Immunsystem aktiviert und die Synthese proinflammatorischer Zytokine gesteigert wird. Ein serologischer oder histologischer Schaden der Leber ist weder in der hier vorliegenden noch in vorhergehenden Arbeiten nachweisbar, allerdings scheint es zu einer geringeren Toleranz gegenüber leberschädigenden Substanzen zu kommen.

4.2 Bakterielle Translokation als vermittelnder Mechanismus

Eine mögliche Ursache für die Zunahme an hepatischen CD45⁺-Zellen ist die Translokation von Bakterien der kommensalen Flora durch eine DSS-induzierte Barrierestörung des Darms. Für den Bakterien-Nachweis wurden zum einen aerobe und anaerobe Blutkulturflaschen mit homogenisiertem Lebergewebe beimpft, zum anderen kam ein kommerziell erhältliches Kit zur Detektion bakterieller DNA aus Gewebeproben zum Einsatz (siehe Kapitel 2.10). Die Rate an mindestens einem positiven Ergebnis lag nach akuter Kolitis bei 40% und nach chronischer Kolitis bei 37,5% im Vergleich zu 0% beziehungsweise 21,4% in der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 3.4 und 3.11). Andere Arbeiten weisen nach DSS-Behandlung für 37%-75% der Tiere eine bakterielle Translokation in die Leber beziehungsweise alternativ eine Erhöhung der Lipopolysaccharid-Level nach [156, 157, 158, 159, 160]. Im Gegensatz hierzu war zwei andere Studien keine Translokation nach 7-tägiger DSS-Gabe detektierbar [127, 161]. Ursächlich für die Varianz in den Translokationsraten könnten unterschiedliche DSS-Schemata, der gewählte Analysezeitpunkt sowie die jeweils verwendeten Nachweismethoden sein. Weniger positive Nachweise könnten insbesondere durch eine kürzere Inkubationszeit sowie die eingeschränkte Auswahl der Nährböden verursacht sein, zudem lässt sich nur ein Teil der kommensalen Darmflora mit konventionellen Kulturtechniken anzüchten [162, 163].

Die Schwierigkeiten im kulturellen Nachweis der Bakterien sollte in der vorliegenden Arbeit durch die PCR-Testung auf bakterielle DNA umgangen werden. Für 50% der positiven Nachweise aus der konventionellen Anzucht zeigte die PCR allerdings kein koncordantes Ergebnis, was für eine niedrige Sensitivität des verwendeten Kits unter den vorliegenden Bedingungen spricht. Es waren – wenn auch in geringerem Ausmaß – auch im Lebergewebe von Kontrolltieren Bakterien nachweisbar, was für eine bakterielle Translokation von Bakterien in die Leber auch in der Abwesenheit einer Kolitis spricht, wobei eine Kontamination nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei einem Teil der DSS-behandelten Tiere Bakterien im Lebergewebe nachweisbar waren, welche möglicherweise die Immunreaktion auslösten. Zur weiteren Klärung dieses Zusammenhangs wäre die Induktion einer Kolitis in keimfrei gehaltenen Tieren im Vergleich zu konventionell gehaltenen SPF-Tieren sinnvoll; keimfreie Haltungsbedingungen standen zum Zeitpunkt der Experimente leider nicht zur Verfügung.

Zu bedenken bleibt, dass einige Kolitis-Modelle in keimfrei gehaltenen Tieren veränderte Verläufe zeigen [164, 165, 166]. Der Besiedlungsstatus der Tiere interferiert auch mit der DSS-Kolitis, die Entwicklung einer Kolitis variiert zwischen verschiedenen Publikationen: In einem Teil von Arbeiten zeigen keimfrei gehaltene Tiere abhängig vom Applikationsschema einen verringerten Entzündungsgrad des Kolons beziehungsweise eine hohe Mortalität ohne Induktion einer Kolitis, während andere Gruppen in keimfrei gehaltenen Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe schwerere Entzündungen induzieren [167, 168, 169, 170, 171, 155]. Mikami *et al.* konnten – trotz histologisch schwererer Kolitis – in keimfreien DSS-behandelten Mäusen den zuvor in SPF-Tieren nachgewiesenen Shift an hepatischen Makrophagen beziehungsweise DC sowie die Vermehrung von mononukleären Zellen in der Leber nicht replizieren. Dies spricht dafür, dass tatsächlich die Darmflora oder Bestandteile hiervon entscheidend an den Leberveränderungen nach Kolitis-Induktion beteiligt sind [155]. Zudem exprimiert ein Teil der aus der Leber isolierten T-Zellen das Integrin $\alpha 4\beta 7$, was für die initiale Aktivierung dieser Zellen im GALT spricht [128].

4.3 Hepatischer Phänotyp im alternativen Kolitis-Modell

Nach oraler Aufnahme von DSS wird dieses resorbiert und ist nicht nur im Darm, sondern auch in weiteren Organen wie Leber, Milz und Lymphknoten nachweisbar. Dabei akkumuliert das DSS insbesondere in den Kupffer-Zellen der Leber, sodass eine lokale Wirkung auf Leberzellen nicht auszuschließen ist [123]. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe eines alternativen Kolitis-Modells nach Transfer von T-Zellen in *Rag1*^{-/-}-Mäuse untersucht, welche Effekte modellunabhängig auf eine Kolitis zurückzuführen sind. Dafür wurde ein Transfer *in vitro* differenzierter Th1- oder Th17-Zellen durchgeführt. Während der Th1-Zelltransfer keine manifeste Kolitis hervorrief, kam es nach Th17-Transfer zu einer milder ausgeprägten Kolitis als nach DSS-Gabe (siehe 3.23). Trotzdem zeigte sich ein ähnlicher hepatischer Phänotyp mit histologisch nachweisbaren Infiltraten, einer erhöhten Anzahl an hepatischen CD45.1⁺- und CD11B⁺LY6C⁺-Zellen sowie erhöhten Frequenzen an CD11B⁺LY6G⁺- und CD11B⁺CD11C⁻-Zellen. Zudem entwickelte sich ein proinflammatorisches Milieu im Sinne erhöhter hepatischer RNA-Expressions-Level von *Ifn γ* , *Tnfa*

und *Il6* (siehe Kapitel 3.28 sowie 3.29).

Da neben den Zellen des angeborenen Immunsystems auch vermehrt IFN- γ ⁺-T-Zellen in der Leber nachweisbar waren, wäre eine direkte Akkumulation der transferierten T-Zellen unabhängig von der Kolitis denkbar. In einem ähnlichen Transfer-Modell konnten Mikami *et al.* jedoch zeigen, dass Empfänger-Tiere nach Re-Transfer von Lamina-propria-CD4⁺-T-Zellen aus *Rag2*^{-/-}-Mäusen mit etablierter Rb^{high}-Transfer-Kolitis ebenfalls eine Kolitis entwickeln. Zugleich kommt es zu einer Akkumulation von mononukleären Zellen in der Leber, ohne dass dort T-Zellen nachweisbar sind [155]. Dies spricht dafür, dass die beobachteten Effekte primär Kolitis-induziert sind. Es scheint also unabhängig vom Auslöser der Kolitis zu einer Akkumulation von Immunzellen in der Leber zu kommen. Dies konnten andere Autoren auch für weitere Modelle nachweisen: So führt die Induktion einer Kolitis durch Gabe von DNBS (*2,4-Dinitrobenzenesulfonic acid*) in der akuten Krankheitsphase ebenfalls zu einer gesteigerten Rekrutierung von Leukozyten in die Leber. Da diese mit Hilfe von intravitaler Mikroskopie untersucht wurde, liegt eine genauere Typisierung der Zellen nicht vor. Trotz erhöhter Leukozytenzahl ist auch in dieser Studie keine Leberzellschädigung laborchemisch nachweisbar [172]. Zudem kann eine erhöhte Anzahl an mononukleären Leberzellen auch nach Entwicklung einer Kolitis in IL10-defizienten Mäusen sowie nach adoptivem Transfer von CD4⁺CD45Rb^{high} in *Rag2*^{-/-}-Mäuse beobachtet werden. Die weitere Analyse der mononukleären Leberzellen zeigt einen Anstieg der hepatischen Makrophagen beziehungsweise cDC mit proinflammatorischen Eigenschaften [155]. Eine Kolitis scheint also unabhängig vom Kolitis-Modell das hepatische Immunsystem zu aktivieren und zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ , TNF- α und IL-6 in der Leber zu führen.

Obwohl der Transfer von Th17-Zellen im Vergleich zur DSS-Gabe eine mildere Kolitis hervorruft, ist nach Transfer-Kolitis die histologisch nachweisbare hepatische Infiltration deutlich stärker ausgeprägt (siehe Abb. 3.11 sowie 3.26). Denkbar wäre, dass die in *Rag2*^{-/-}-Mäusen fehlende regulatorische Aktivität der Foxp3⁺-T-Zellen für diese Exazerbation verantwortlich ist, während in den DSS-behandelten Wildtypen die funktionalen regulatorischen T-Zellen eine Schädigung der Leber durch die infiltrierenden Immunzellen verhindert. Diese Hypothese passt zu der Beobachtung, dass PSC-Patienten eine Störung der regulatorischen T-Zell-Antwort aufweisen [173].

4.4 Mildere Lebererkrankung in $Mdr2^{-/-}$ - Mäusen nach Kolitis

Eine Fibrose und die schlussendlich daraus resultierende Leberzirrhose ist die Endstrecke vieler Lebererkrankungen, welche regelhaft mit Entzündungsreaktionen, Leberzellschädigung und einer vermehrten Narbenbildung einhergehen [174]. $CD11B^+LY6C^+F4/80^+$ -Zellen, welche sich von inflammatorischen Monozyten ableiten, werden CCL2-abhängig rekrutiert und bilden eine zentrale pro-fibrotische Zellpopulation nach Gabe von Tetrachlormethan [175]. Auch in weiteren Organen wie den Nieren und der Lunge scheint diese Population essentiell an der Fibroseentstehung beteiligt zu sein [176, 177]. Aufgrund der in dieser Arbeit in C57Bl/6-Mäusen nachgewiesenen Veränderung der hepatischen Zellkomposition sowie der erhöhten RNA-Expressionslevel von *Ccl2*, *Ifn γ* , *Tnfa* und *Il6* nach chronischer DSS-Kolitis sollte getestet werden, ob die durch eine chronische Kolitis hervorgerufenen hepatischen Veränderungen die Lebererkrankung in $Mdr2^{-/-}$ -Mäusen verschlechtert.

Die Effekte einer DSS-Kolitis auf den hepatischen Phänotyp von $Mdr2^{-/-}$ -Mäusen sind bisher nicht untersucht worden. Heterozygote $Mdr2^{+/-}$ -Tiere zeigen nach chronischer DSS-Behandlung über 5 Zyklen milde portale Entzündungsinfiltrate. Allerdings entwickelt sich kein PSC-ähnlichen Leberschaden, wie er bei homozygoten $Mdr2^{-/-}$ -Tieren ohne weitere Intervention entsteht [127].

Alternative Modelle, welche die Leber für Schäden prädisponieren beziehungsweise mit einer Fibrosierung der Leber einhergehen, wurden durch Kombination mit einer DSS-Kolitis verstärkt: Die Dysfunktion eines Ionenkanals (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, CFTR) führt zur Mukoviszidose, welche primär die Lunge betrifft, aber in rund einem Drittel der Fälle auch zu einem chronischen Leberschaden führt [178]. $Cftr^{-/-}$ -Mäuse zeigen zunächst keine Beeinträchtigung ihrer Leberfunktion. Sie entwickeln erst nach Induktion einer DSS-Kolitis eine histologisch nachweisbare Gallengangsentzündung sowie erhöhte Serum-Level der alkalischen Phosphatase als Marker für eine Cholestase. Ein fibrotischer Umbau ist allerdings nicht zu beobachten [179]. Nach zusätzlicher niedrigdosierter Gabe von DDC (1,4-Dihydro-2,4,6-trimethylpyridin-3,5-dicarbonsäurediethylester) kommt es nur in DSS-behandelten $Cftr^{+/-}$ - sowie $Cftr^{-/-}$ -Mäusen zur Fibroseentwicklung, während weder Wildtypen noch $Cftr^{-/-}$ -Tiere mit niedrigdosierter DDC-Fütterung ohne zusätzliche DSS-Gabe eine Leberschädigung entwickeln [180]. Für das Modell der nicht-alkoholischen Steatohepatitis konnte ebenfalls eine gesteigerte hepatische Entzündung sowie Fibrose nach DSS-Exposition nachgewiesen werden [160]. Auch eine Antigen-abhängige Cholangitis durch Transfer von Ovalbumin-spezifischen OT-I-Zellen in ASBT-OVA-Mäuse, deren Cholangiozyten Ovalbumin exprimieren, wird durch eine vorhergehende DSS-Kolitis verschlechtert [128]. Es gibt also Hinweise darauf, dass eine DSS-Kolitis Leberpathologien mit assoziierter Fibrosierung exazerbiert.

Überraschenderweise zeigte sich in den hier vorliegenden Ergebnissen eine serologische und histologische Verbesserung in *Mdr2*^{-/-}-Mäusen nach chronischer DSS-Behandlung (siehe Abbildung 3.18). Die Analyse der hepatischen Zellzusammensetzung erbrachte dabei ähnliche Ergebnisse wie in den Versuchen in C57Bl/6-Mäusen: Nach DSS-Gabe akkumulierten Immunzellen in der Leber. Insbesondere die Frequenzen von CD11B⁺LY6G⁺- und CD11B⁺LY6C⁺-Zellen sowie der IFN- γ ⁺IL-17A⁺-T-Zellen waren erhöht. Im Unterschied zu C57Bl/6-Mäusen induzierte die DSS-Kolitis in den *Mdr2*^{-/-}-Mäusen keine Zunahme von IL-17A⁺-T-Zellen oder regulatorischen T-Zellen, insgesamt befanden sich die regulatorischen T-Zellen aber schon in den unbehandelten *Mdr2*^{-/-}-Mäusen auf einem deutlich höheren Niveau. Trotz des ähnlichen Zellinfiltrats in der Leber zeigten die DSS-behandelten *Mdr2*^{-/-}-Mäuse nicht das in C57Bl/6-Mäusen vorliegende proinflammatorische Zytokin-Milieu: Die hepatische RNA-Expression von *Il6*, *Ccl2* und *Nos2* war erniedrigt, die in C57Bl/6-Mäusen vorliegende *Tnfa*-Erhöhung blieb aus, zudem lagen erhöhte Level an *Il10* vor. Denkbare Einflussfaktoren auf die ausbleibende Verschlechterung des hepatischen Phänotyps sind ein direkter Effekt des DSS, die veränderte Zytokinproduktion, die Induktion regulatorischer Immunzellen oder eine Veränderung des Gallensäurenmetabolismus beziehungsweise der Gallenzusammensetzung.

Direkter Effekt des DSS

DSS ist nach oraler Aufnahme nicht nur gastrointestinal, sondern systemisch auch in weiteren Organen und insbesondere in der Leber nachweisbar [123]. Zudem beeinflusst eine akute DSS-Kolitis nicht nur lokal den Darm, sondern zusätzlich den systemischen Fett- und Aminosäuremetabolismus [181]. Es könnte also ein systemischer Effekt des DSS auf den *Mdr2*^{-/-}-Phänotyp - unabhängig von den induzierten hepatischen Zellveränderungen - vorliegen. *In vitro*-Studien zeigen eine direkte zytotoxische Wirkung von DSS, welches sich an den Zellkern anlagert und den Zellzyklus stoppt [182]. Da sich das DSS bevorzugt in den Kupffer-Zellen der Leber ablagert, könnte es hier direkt zytotoxisch wirken. Kupffer-Zell-depletierte Tiere zeigen eine Unterdrückung der HSC-Aktivierung sowie kaum Fibrose nach LPS-Exposition [183]. Ob die hepatische DSS-Konzentration *in vivo* für eine zytotoxische Wirkung ausreicht, ist unklar. Eine semiquantitative Untersuchung zeigte nach 7-tägiger DSS-Gabe allerdings ähnliche Konzentrationen von DSS in Leber, mesenterialen Lymphknoten sowie Kolongewebe [123]. Zur weitergehenden Beleuchtung dieser Hypothesen wäre die Induktion einer alternativen, bestenfalls nicht-chemischen, Kolitis in *Mdr2*^{-/-}-Mäusen sinnvoll, um den Einfluss der Kolitis von systemischen DSS-Effekten abzugrenzen. Die Kreuzung von *Mdr2*^{-/-}- sowie *Rag1*^{-/-}-Mäuse ist derzeit in Bearbeitung, um anschließend in diesen Tieren den Effekt einer Transfer-Kolitis zu analysieren.

Hepatische Zytokinexpression

Nach DSS-Kolitis zeigten sich in $Mdr2^{-/-}$ -Tieren insbesondere veränderte Expressionslevel von $Il6$, $Il10$ und $Ccl2$. Interleukin 6 ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin im Rahmen von Infektionen; Patienten mit akuten und chronischen Lebererkrankungen zeigen deutlich erhöhte IL-6-Werte. Trotzdem besitzt es im Kontext einer murinen Leberfibrose einen protektiven Effekt: so entwickeln Tetrachlormethan-exponierte $Il6^{-/-}$ -Mäuse sowie $Il6^{-/-}$ - $Mdr2^{-/-}$ -Mäuse eine deutlichere Leberfibrose [184, 185]. Nach DSS-Kolitis in C57Bl/6-Mäusen waren die $Il6$ -Expressionslevel erhöht, was einen protektiven Effekt im $Mdr2^{-/-}$ -Modell hätte herbeiführen können. Hier zeigten sich die $Il6$ -Level allerdings signifikant erniedrigt (siehe Abbildung 3.21).

Die gezeigten erhöhten $Il10$ -Expressionslevel könnten den protektiven Effekt der Kolitis im $Mdr2^{-/-}$ -Modell vermitteln: In verschiedenen Tiermodellen entwickeln $Il10$ -defiziente Tiere eine stärkere Fibrose, während eine $Il10$ -Gentherapie die Fibrosebildung abmildert [186, 187]. In Ratten führt zudem die Induktion einer Kolitis durch Gabe von Trinitrobenzolsulfonsäure zu einer erhöhten hepatischen IL-10-Produktion, Tiere mit einer Kolitis sind geschützt gegen eine akute cholestatische Hepatitis nach Applikation von Alpha-Naphthylisothiozyanat [188]. Eine Bandbreite an Zellen kann IL-10 produzieren, darunter DC, Makrophagen, Neutrophile oder Lymphozyten. Ein Auslöser für die IL-10-Produktion ist die Aktivierung verschiedener Mustererkennungsrezeptoren durch Bakterien oder bakterielle Bestandteile [189]. Denkbar wäre also, dass die verstärkte bakterielle Translokation ursächlich für die gesteigerte IL10-Produktion ist. Passend dazu zeigen keimfrei gehaltene $Mdr2^{-/-}$ -Mäuse einen deutlicheren Leberschaden [115]. Zur weiteren Untersuchung dieses Zusammenhangs wäre die Induktion einer Kolitis nach IL-10-Blockade oder in $Il10^{-/-}$ - $Mdr2^{-/-}$ -Tieren sowie keimfrei-gehaltenen $Mdr2^{-/-}$ -Tieren sinnvoll. Dabei wäre eine genau Kontrolle der Kolitis-Schwere nötig, da $Il10^{-/-}$ -Tiere schon spontan eine Kolitis entwickeln [190].

Induktion regulatorischer Immunzellen

Möglich wäre, dass es sich bei den beschriebenen $CD11B^{+}LY6C^{+}$ sowie $CD11B^{+}LY6G^{+}$ -Zellen statt um inflammatorische Zellen um sogenannte myeloide Suppressorzellen (*Myeloid derived suppressor cells*, MDSC) handelt. Insbesondere $LY6C^{+}$ -MDSC scheinen in einigen Mausmodellen vor Fibrose zu schützen: So vermindern durch Gallengangsligatur induzierte hepatische $CD11B^{+}LY6C^{+}$ -Zellen *in vitro* die T-Zell-Proliferation. Die Störung dieser suppressiven Kapazität der $CD11B^{+}LY6C^{+}$ -Zellen durch Gabe von all-trans-Retinsäure führt umgekehrt zu einer verstärkten Fibrose nach Gallengangsligatur [191]. In einer weiteren Studie führte die Infusion von $CD11B^{+}GR1^{+}$ -Knochenmarkszellen in Tieren mit einer vorbestehenden Tetrachlormethan-verursachten Leberfibrose über einen IL-

10-abhängigen Mechanismus zur Senkung von Fibrosemarkern [192]. Passend dazu war in den DSS-behandelten *Mdr2*^{-/-}-Mäusen neben den CD11B⁺LY6C⁺- und CD11B⁺LY6G⁺-Populationen die hepatische Expression von *Il10* erhöht (siehe Abbildung 3.21), sodass ein ähnlicher Mechanismus möglich wäre. Mit den vorliegenden Daten können MDSC als potentielle IL-10-Produzenten sowie kausale Ursache der Fibrose mildering allerdings nicht bewiesen werden. Hierfür ist eine weitergehende Charakterisierung der akkumulierenden CD11B⁺LY6C⁺ sowie CD11B⁺LY6G⁺-Zellen nötig. Im Kontext tumorinduzierter Modelle zeigen MDSC eine potente T-Zell-Suppression über die L-Arginin-Depletion durch Arginase (*Arg1*) beziehungsweise Stickstoffmonoxid-Synthase (*Nos2*) sowie Produktion reaktiver Sauerstoffspezies [193, 194, 195]. In der RNA-Analyse aus Lebergewebe in DSS-behandelten *Mdr2*^{-/-}-Mäusen zeigte sich lediglich die Expression von *Arg1* erhöht, die Level von *Nos2* waren im Vergleich zu unbehandelten *Mdr2*^{-/-}-Tieren erniedrigt (siehe 3.21).

Aktuell ist die Unterscheidung von inflammatorischen und suppressiven CD11B⁺LY6C⁺-Zellen nur mittels funktionaler Assays möglich [196]. Für hepatische Zellen chronisch DSS-behandelter Mäuse stehen diese Ergebnisse jedoch noch aus.

Gallensäuremetabolismus

Die mit der Gallenflüssigkeit ausgeschiedenen Gallensäuren unterliegen dem enterohepatischen Kreislauf, sie werden nach ihrer Sekretion in das Darmlumen zum Großteil resorbiert und rezirkulieren über die Blutbahn zur Leber. Ein Teil der Gallensäuren wird von der intestinalen Flora dekonjugiert und mit dem Stuhl ausgeschieden [197]. Im *Mdr2*^{-/-}-Modell wirkt die gestörte Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit zelltoxisch und führt über eine Entzündungsreaktion zu einer obliterativen Cholangitis [114]. Es sind verschiedene Interaktionen zwischen der DSS-Kolitis und *Mdr2*^{-/-}-Phänotyp denkbar:

Die deutliche Diarrhoe unter DSS-Gabe könnte durch eine beschleunigte Magen-Darm-Passage zu einer vermehrten Ausscheidung von Gallensäuren führen und dadurch die Ratio an Gallensäure zu Phospholipiden normalisieren. Zudem könnte die Kolitis die Expression von intestinalen Gallensäuretransportern stören, wie für UC und CD Patienten bereits gezeigt wurde [198]. Wird die intestinale Reabsorption von Gallensäuren durch die medikamentöse Blockade eines intestinalen Gallensäuretransporters (*apical sodium-dependent bile acid transporter*, ASBT) in *Mdr2*^{-/-}-Mäusen inhibiert, steigt die fäkale Gallensäureausscheidung und der Leberschaden wird abgemildert [199].

Alternativ könnte auch eine vermehrte Metabolisierung der Gallensäuren stattfinden, wie für DSS-behandelte Wildtypen gezeigt wurde [200]. Eine DSS-Kolitis führt außerdem zu einer deutlich veränderten bakteriellen Mikroflora [201]. Diese ist wiederum essentiell für den Gallensäuremetabolismus [202]. In DSS-behandelten Ratten und auch Mäusen zeigen sich Veränderungen der intestinalen Besiedlung sowie der Gallensäurezusammensetzung

im Stuhl [203, 200]. Eine keimfreie Haltung von $Mdr2^{-/-}$ -Mäusen verstärkt deren Leberschaden, als potentiell vermittelnder Mechanismus wird eine verminderte Produktion sekundärer Gallensäuren vermutet, welche *in vitro* die Seneszenz humaner Cholangiozyten verhindern [115]. Aktuell sind keine Untersuchungen zum Gallensäuremetabolismus aus DSS-behandelten $Mdr2^{-/-}$ -Mäusen verfügbar. $Mdr^{+/-}$ -Tier zeigen allerdings keine wesentliche Änderung der hepatischen Gallentransporter nach DSS-Kolitis, wobei die intestinale Expression in dieser Arbeit nicht untersucht wurde [127]. Dikopoulos *et al.* zeigten hingegen eine Induktion von CYP7A1 als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Gallensynthese in DSS-behandelten Ratten [204].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Gallensäuren-Metabolismus nicht untersucht, es kann also keine Aussage zur Interaktion mit einer DSS-Kolitis getroffen werden. Insbesondere im Kontext des Konzepts der *toxischen Galle* als Pathomechanismus des $Mdr2^{-/-}$ -Phänotyps sowie der diskutierten Ergebnisse aus vorhergehenden Arbeiten sind hierzu aktuell allerdings Untersuchungen von Gallenproduktion und -zusammensetzung sowie Transporterexpression in DSS-behandelten $Mdr2^{-/-}$ -Tieren in Bearbeitung.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass eine DSS-Kolitis den Lipid-Metabolismus in Mäusen und Hamstern beeinflusst und dadurch Triglycerid-Level in Leber und Serum erhöht [205, 156]. Störungen im Lipid-Stoffwechsel werden ebenfalls in $Mdr2^{-/-}$ -Mäusen beobachtet, sie weisen erniedrigte Konzentrationen von Triglyceriden, Cholesterin und Phospholipiden auf. Diese Störungen sind unter Gabe von norUDCA beziehungsweise einer speziellen fettangereicherten Nahrung reversibel und gehen mit einer deutlichen Verbesserung der Leberhistologie sowie serologischer Marker einher [206]. Eine Verminderung des Leberschadens in $Mdr2^{-/-}$ -Mäusen könnte also auch auf der Interaktion des DSS mit dem Lipid-Metabolismus beruhen, dieser Aspekt wurde in dieser Arbeit jedoch nicht weitergehend untersucht.

4.5 Zusammenfassung

Die Pathogenese der PSC und der epidemiologische Zusammenhang von PSC und CED sind unklar. Die Differenzierung von primär auslösender Ursache und sekundärer Folgeerscheinung ist bei regelhafter Befunderhebung im fortgeschrittenen Krankheitsstadium erschwert. In dieser Arbeit wurden daher der Einfluss einer Kolitis auf die gesunde so wie vorerkrankte Leber im Mausmodell untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Kolitis im Mausmodell - unabhängig von der Art der Induktion - eine Anreicherung von Immunzellen in der Leber hervorruft. In immunkompetenten Wildtyp-Mäusen zeigte sich jedoch keine histologisch oder laborchemisch nachweisbare Leberschädigung. Im alternativen Modell der Transfer-Kolitis kommt es in $Rag1^{-/-}$ Mäusen hingegen zu einer histologisch nachweisbaren Leberschädigung nach

Transfer von Th17-Zellen, eine mögliche Ursache könnte die in Rag1^{-/-} Mäusen fehlende regulatorische T-Zell-Antwort sein.

In Mäusen mit einem vorbestehenden PSC-ähnlichen Leberschaden war nach Induktion einer DSS-Kolitis ebenfalls eine Zunahme von Immunzellen nachweisbar. Entgegen der ursprünglichen angenommenen Hypothese führte diese jedoch nicht zu einer verstärkten Fibrosierung, sondern zu einer Verbesserung serologischer und histologischer Marker der Lebererkrankung. Mit den hier verfügbaren Daten ist eine abschließende Beurteilung jedoch nicht möglich. Die Translokation von Bakterien in die Leber könnte die Anreicherung von Immunzellen in der Leber erklären, wobei auch hier weitere Untersuchungen nötig sind, um diese Hypothese zu testen. In Anbetracht der wenig verstandenen Pathogenese der PSC sowie der limitierten Therapieoptionen für Patienten ist weitere Forschung auf diesem Feld erforderlich.

4.6 Abstract

Pathogenesis of PSC as well as epidemiological association with inflammatory bowel disease remain poorly understood. Diagnosis is often made in advanced state of PSC, hence hindering discrimination of primary cause and secondary effects of the disease. Thus, this works aimed to explore effects of an induced colitis on the liver of healthy mice as well as mice with pre-existing liver disease.

We found that colitis - independent of the model used for induction - resulted in accumulation of immune cells in the liver. However, infiltrating immune cells did not induce tissue damage as assessed by histology or liver enzymes in immune-competent wild type mice. In contrast the T-cell mediated colitis model, in which regulatory T cells are largely absent, was associated with a significant liver inflammation and pathology.

Transgenic mice with pre-existing liver pathology similar to PSC also showed increased numbers of hepatic immune cells. In contrast to the initial hypothesis, this was not associated with aggravated liver-pathology. Instead, serological and histological markers of disease improved. Translocation of bacteria or bacterial components might cause the observed influx of immune cells to the liver, but final evidence can not be provided with data present from this work. Considering the elusive pathogenesis of PSC and limited therapy options for patients, further investigation in this field is needed.

5. Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , Varianzanalyse
APC	<i>Antigen presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
AST	Aspartat-Aminotransferase
CCL25	<i>C-C motif chemokine ligand 25</i>
CCl ₄	Tetrachlormethan
CD	<i>Crohn's disease</i> , Morbus Crohn
cDC	Klassische dendritische Zellen
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
DC	<i>Dendritic cell</i> , dendritische Zellen
DDC	1,4-Dihydro- 2,4,6-trimethylpyridin-3,5- dicarbonsäurediethylester
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat-behandeltes Wasser
DSS	<i>Dextran sodium sulfate</i> , Dextran-Natrium-Sulfat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GALT	<i>Gut associated lymphoid tissue</i> , darmassoziiertes lymphatisches Gewebe
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
HLA-System	Humanes Leukozytenantigen-System
Hprt	Hypoxanthin- Guanin-Phosphoribosyltransferase
IBD	<i>Inflammatory bowel disease</i> , chronisch entzündliche Darmerkrankung
IEL	Intraepithelialen Lymphozyten
Il	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> , Iscoves Flüssigmedium
LPL	Lamina Propria Lymphozyten
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i> magnetische Zellseparation
MADCAM1	<i>Mucosal addressin cell adhesion molecule 1</i>
Mdr2	<i>Multi drug resistance gene 2</i>
MDSC	<i>Myeloid derived suppressor cell</i> , myeloide Suppressorzelle
mHAI	Modifizierter histologischer Aktivitätsindex

mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
NET	<i>Neutrophil extracellular Trap</i> , neutrophile extrazelluläre Falle
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
NOD2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2</i>
p-ANCA	Perinukleäre Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pDC	Plasmazytoide dendritische Zellen
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
qPCR	Quantitative Realtime-PCR
rcf	<i>Relative centrifugal force</i> , relative Zentrifugalbeschleunigung
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
UC	<i>Ulcerative colitis</i> , Colitis ulcerosa
UDCA	<i>Ursodeoxycholic acid</i> , Ursodeoxycholsäure
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

6. Literaturverzeichnis

- [1] HIRSCHFIELD, Gideon M. ; KARLSEN, Tom H. ; LINDOR, Keith D. ; ADAMS, David H.: Primary sclerosing cholangitis. In: *Lancet* 382 (2013), S. 1587–1599. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60096-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60096-3). – DOI 10.1016/S0140-6736(13)60096-3
- [2] EATON, John E. ; TALWALKAR, Jayant a. ; LAZARIDIS, Konstantinos N. ; GORES, Gregory J. ; LINDOR, Keith D.: Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and advances in diagnosis and management. In: *Gastroenterology* 145 (2013), sep, Nr. 3, 521–36. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.06.052>. – DOI 10.1053/j.gastro.2013.06.052. – ISSN 1528-0012
- [3] CLAESSEN, Marian M H. ; VLEGGAR, Frank P. ; TYTGAT, Kristien M a J. ; SIERSEMA, Peter D. ; BUUREN, Henk R.: High lifetime risk of cancer in primary sclerosing cholangitis. In: *J. Hepatol.* 50 (2009), jan, Nr. 1, 158–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2008.08.013>. – DOI 10.1016/j.jhep.2008.08.013. – ISSN 0168-8278
- [4] LINDOR, Keith D. ; KOWDLEY, Kris V. ; HARRISON, M E.: ACG Clinical Guideline : Primary Sclerosing Cholangitis. In: *Am. J. Gastroenterol.* 110 (2015), Nr. 5, 646–659. <http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2015.112>. – DOI 10.1038/ajg.2015.112. – ISSN 0002-9270
- [5] BJØRO, K ; BRANDSÆTER, B ; FOSS, Aksel ; SCHRUMPF, Erik: Liver transplantation in primary sclerosing cholangitis. In: *Semin. liver ...* 26 (2006), Nr. 1, 69–79. <http://europepmc.org/abstract/med/16496235>
- [6] BAMBHA, K ; KIM, WR ; TALWALKAR, J ; BENSON, Joanne T. ; THERNEAU, Terry M. ; LOFTUS, Edward V. ; YAWN, Barbara P. ; DICKSON, E R. ; III, L Joseph M.: Incidence, clinical spectrum, and outcomes of primary sclerosing cholangitis in a United States community. In: *Gastroenterology* 125 (2003), Nr. 03, 1364–1369. [http://dx.doi.org/10.1053/S0016-5085\(03\)01356-8](http://dx.doi.org/10.1053/S0016-5085(03)01356-8). – DOI 10.1053/S0016-5085(03)01356-8

- [7] BOBERG, K M. ; AADLAND, E ; JAHNSEN, J ; RAKNERUD, N ; STIRIS, M ; BELL, H: Incidence and Prevalence of Primary Biliary Cirrhosis, Primary Sclerosing Cholangitis, and Autoimmune Hepatitis in a Norwegian Population. In: *Scand. J. Gastroenterol.* 33 (1998), jan, Nr. 1, 99–103. <http://dx.doi.org/10.1080/00365529850166284>. – DOI 10.1080/00365529850166284. – ISSN 0036–5521
- [8] KAPLAN, Gilaad G. ; LAUPLAND, Kevin B. ; BUTZNER, Decker ; URBANSKI, Stefan J. ; LEE, Samuel S.: The burden of large and small duct primary sclerosing cholangitis in adults and children: a population-based analysis. In: *Am. J. Gastroenterol.* 102 (2007), may, Nr. 5, 1042–9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01103.x>. – DOI 10.1111/j.1572–0241.2007.01103.x. – ISSN 0002–9270
- [9] BOONSTRA, Kirsten ; BEUERS, Ulrich ; PONSIOEN, Cyriel Y.: Epidemiology of primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis: a systematic review. In: *J. Hepatol.* 56 (2012), may, Nr. 5, 1181–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.10.025>. – DOI 10.1016/j.jhep.2011.10.025. – ISSN 1600–0641
- [10] O'TOOLE, Aoibhlinn ; ALAKKARI, Alaa ; KEEGAN, Denise ; DOHERTY, Glen ; MULCAHY, Hugh ; O'DONOGHUE, Diarmuid: Primary sclerosing cholangitis and disease distribution in inflammatory bowel disease. In: *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 10 (2012), apr, Nr. 4, 439–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2011.11.010>. – DOI 10.1016/j.cgh.2011.11.010. – ISSN 1542–7714
- [11] ESCORSELL, Angels ; PARÉS, A ; RODÉS, J ; SOLÍS-HERRUZO, J A. ; MIRAS, Manuel ; MORENA, E de l.: Epidemiology of primary sclerosing cholangitis in Spain. Spanish Association for the Study of the Liver. In: *J. Hepatol.* 21 (1994), nov, Nr. 5, 787–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7890895>. – ISSN 0168–8278
- [12] SCHRUMPF, E ; ABDELNOOR, M ; FAUSA, O ; ELGJO, K ; JENSSEN, E ; KOLMANNSSKOG, F: Risk factors in primary sclerosing cholangitis. In: *J. Hepatol.* 21 (1994), dec, Nr. 6, 1061–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7699228>. – ISSN 0168–8278
- [13] BROOME, U ; OLSSON, R ; LOOF, L ; BODEMAR, G ; HULTCRANTZ, R ; DANIELSSON, A ; PRYTZ, H ; SANDBERG-GERTZEN, H ; WALLERSTEDT, S ; LINDBERG, G: Natural history and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis. In: *Gut* 38 (1996), Nr. 4, S. 610–615
- [14] ANG, Tiing L. ; FOCK, Kwong M. ; NG, Tay M. ; TEO, Eng K. ; CHUA, Tju S. ; TAN, Jessica Yi-lyn: Clinical profile of primary sclerosing cholangitis in Singapore. In: *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17 (2002), aug, Nr. 8, 908–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12164967>. – ISSN 0815–9319

- [15] ARON, Jonathan H. ; BOWLUS, Christopher L.: The immunobiology of primary sclerosing cholangitis. In: *Semin. Immunopathol.* 31 (2009), sep, Nr. 3, 383–97. <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-009-0154-7>. – DOI 10.1007/s00281-009-0154-7. – ISSN 1863–2300
- [16] BOONSTRA, Kirsten ; ERPECUM, Karel J. ; NIEUWKERK, Karin M J. ; DRENTH, Joost P H. ; POEN, Alexander C. ; WITTEMAN, Ben J M. ; TUYNMAN, Hans a R E. ; BEUERS, Ulrich ; PONSIOEN, Cyriel Y.: Primary sclerosing cholangitis is associated with a distinct phenotype of inflammatory bowel disease. In: *Inflamm. Bowel Dis.* 18 (2012), dec, Nr. 12, 2270–6. <http://dx.doi.org/10.1002/ibd.22938>. – DOI 10.1002/ibd.22938. – ISSN 1536–4844
- [17] SAICH, Rebecca ; CHAPMAN, Roger: Primary sclerosing cholangitis, autoimmune hepatitis and overlap syndromes in inflammatory bowel disease. In: *World J. Gastroenterol.* 14 (2008), jan, Nr. 3, 331–7. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2679122&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. – ISSN 1007–9327
- [18] LOFTUS, E V. ; HAREWOOD, G C. ; LOFTUS, C G. ; TREMAINE, W J. ; HARMSSEN, W S. ; ZINSMEISTER, a R. ; JEWELL, D a. ; SANDBORN, W J.: PSC-IBD: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. In: *Gut* 54 (2005), jan, Nr. 1, 91–6. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2004.046615>. – DOI 10.1136/gut.2004.046615. – ISSN 0017–5749
- [19] JØRGENSEN, Kristin K. ; GRZYB, Krzysztof ; LUNDIN, Knut E a. ; CLAUSEN, Ole Petter F. ; AAMODT, Geir ; SCHRUMPF, Erik ; VATN, Morten H. ; BOBERG, Kirsten M.: Inflammatory bowel disease in patients with primary sclerosing cholangitis: clinical characterization in liver transplanted and nontransplanted patients. In: *Inflamm. Bowel Dis.* 18 (2012), mar, Nr. 3, 536–45. <http://dx.doi.org/10.1002/ibd.21699>. – DOI 10.1002/ibd.21699. – ISSN 1536–4844
- [20] RUST, Christian ; BRAND, Stephan: PSC: Protect and serve with colitis: does it help the liver to have severe ulcerative colitis? In: *Gut* 60 (2011), sep, Nr. 9, 1165–6. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2011.240309>. – DOI 10.1136/gut.2011.240309. – ISSN 1468–3288
- [21] JOO, Mee ; LIMA, Paula Abreu-e ; FARRAYE, Francis ; SMITH, Timothy ; SWAROOP, Prabhakar ; GARDNER, Laura ; LAUWERS, Gregory Y. ; ODZE, Robert D.: Pathologic features of ulcerative colitis in patients with primary sclerosing cholangitis: a case-control study. In: *Am. J. Surg. Pathol.* 33 (2009), jun,

- Nr. 6, 854–62. <http://dx.doi.org/10.1097/PAS.0b013e318196d018>. – DOI 10.1097/PAS.0b013e318196d018. – ISSN 1532–0979
- [22] RABINOVITZ, Mordechai ; GAVALER, Judith S. ; SCHADE, Robert R. ; DINDZANS, Vincents J. ; CHIEN, Mai-Ching ; VAN THIEL, David H.: Does primary sclerosing cholangitis occurring in association with inflammatory bowel disease differ from that occurring in the absence of inflammatory bowel disease? A study of sixty-six subjects. In: *Hepatology* 11 (1990), jan, Nr. 1, 7–11. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.1840110103>. – DOI 10.1002/hep.1840110103. – ISSN 02709139
- [23] NAVANEETHAN, U ; VENKATESH, P G K. ; LASHNER, B a. ; SHEN, B ; KIRAN, R P.: The impact of ulcerative colitis on the long-term outcome of patients with primary sclerosing cholangitis. In: *Aliment. Pharmacol. Ther.* 35 (2012), Nr. 9, 1045–53. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2036.2012.05063.x>. – DOI 10.1111/j.1365-2036.2012.05063.x. – ISBN 0269–2813
- [24] YANAI, Henit ; MATALON, Shay ; ROSENBLATT, Amir ; AWADIE, Halim ; BERDICHEVSKI, T. ; SNIR, Y. ; KOPYLOV, U. ; KATZ, L. ; STEIN, A. ; MLYNARSKY, L. ; TULCHINSKY, H. ; KONIKOFF, F. M. ; BEN HORIN, S. ; BRAUN, M. ; BEN-ARI, Z. ; CHOWERS, Y. ; BARUCH, Y. ; SHIBOLET, O. ; DOTAN, I.: Prognosis of Primary Sclerosing Cholangitis in Israel is Independent of Coexisting Inflammatory Bowel Disease. In: *J. Crohn's Colitis* 9 (2015), feb, Nr. 2, 177–184. <http://dx.doi.org/10.1093/ecco-jcc/jju013>. – DOI 10.1093/ecco-jcc/jju013. – ISSN 1873–9946
- [25] CANGEMI, John R. ; WIESNER, Russell H. ; BEAVER, Sandra J. ; LUDWIG, Jurgen ; MACCARTY, R L. ; DOZOIS, Roger R. ; ZINSMEISTER, Alan R. ; LARUSSO, N F.: Effect of proctocolectomy for chronic ulcerative colitis on the natural history of primary sclerosing cholangitis. In: *Gastroenterology* 96 (1989), mar, Nr. 3, 790–4. [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085\(89\)80078-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085(89)80078-2). – DOI 10.1016/S0016-5085(89)80078-2. – ISSN 0016–5085
- [26] MARELLI, Laura ; XIROUCHAKIS, Elias ; KALAMBOKIS, Georgios ; CHOLONGITAS, Evangelos ; HAMILTON, Mark I. ; BURROUGHS, Andrew K.: Does the severity of primary sclerosing cholangitis influence the clinical course of associated ulcerative colitis? In: *Gut* 60 (2011), sep, Nr. 9, 1224–8. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2010.235408>. – DOI 10.1136/gut.2010.235408. – ISSN 1468–3288
- [27] VERA, Alonso ; MOLEDINA, Shazma ; GUNSON, Bridget ; HUBSCHER, Stefan ; MIRZA, Darius ; OLLIFF, Simon ; NEUBERGER, James: Risk factors for recurrence of primary sclerosing cholangitis of liver allograft. In: *Lancet (London, England)* 360

- (2002), Nr. 9349, 1943–4. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11861-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11861-7). – DOI 10.1016/S0140-6736(02)11861-7. – ISSN 0140-6736
- [28] ALABRABA, Edward ; NIGHTINGALE, Peter ; GUNSON, Bridget ; HUBSCHER, Stefan ; OLLIFF, Simon ; MIRZA, Darius ; NEUBERGER, James: A re-evaluation of the risk factors for the recurrence of primary sclerosing cholangitis in liver allografts. In: *Liver Transpl.* 15 (2009), mar, Nr. 3, 330–40. <http://dx.doi.org/10.1002/lt.21679>. – DOI 10.1002/lt.21679. – ISSN 1527-6473
- [29] GERSHWIN, M E. ; VIERLING, John M. ; MANNS, Michael P. ; GERSHWIN, M. E. (Hrsg.) ; VIERLING, John M. (Hrsg.) ; MANNS, Michael P. (Hrsg.): *Liver Immunology*. Cham : Springer International Publishing, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-02096-9>. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-02096-9>. – ISBN 978-3-319-02095-2
- [30] CHAPMAN, Roger: Etiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis. In: *World J. Gastroenterol.* 14 (2008), Nr. 21, 3350. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.14.3350>. – DOI 10.3748/wjg.14.3350. – ISSN 1007-9327
- [31] BERGQUIST, A ; MONTGOMERY, S ; BAHMANYAR, S ; OLSSON, R ; DANIELSSON, A ; LINDGREN, S ; PRYTZ, H ; HULTCRANTZ, R ; LOOF, L ; SANDBERGGERTZEN, H: Increased Risk of Primary Sclerosing Cholangitis and Ulcerative Colitis in First-Degree Relatives of Patients With Primary Sclerosing Cholangitis. In: *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 6 (2008), aug, Nr. 8, 939–943. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2008.03.016>. – DOI 10.1016/j.cgh.2008.03.016. – ISSN 15423565
- [32] NÆSS, Sigrid ; SHIRYAEV, Alexey ; HOV, Johannes R. ; FRANKE, Andre ; KARLSEN, Tom H.: Genetics in primary sclerosing cholangitis. In: *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 36 (2012), aug, Nr. 4, 325–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinre.2012.02.003>. – DOI 10.1016/j.clinre.2012.02.003. – ISBN 2210-7401
- [33] KARLSEN, Tom H. ; FRANKE, Andre ; MELUM, Espen ; KASER, Arthur ; HOV, Johannes R. ; BALSCHUN, Tobias ; LIE, Benedicte A. ; BERGQUIST, Annika ; SCHRAMM, Christoph ; WEISMÜLLER, Tobias J. ; GOTTHARDT, Daniel ; RUST, Christian ; PHILIPP, Eva E. ; FRITZ, Teresa ; HENCKAERTS, Liesbet ; WEERSMA, Rinse K. ; STOKKERS, Pieter ; PONSIOEN, Cyriel Y. ; WIJMENGA, Cisca ; STERNECK, Martina ; NOTHNAGEL, Michael ; HAMPE, Jochen ; TEUFEL, Andreas ; RUNZ, Heiko ; ROSENSTIEL, Philip ; STIEHL, Adolf ; VERMEIRE, Severine ; BEUERS, Ulrich ; MANNS, Michael P. ; SCHRUMPF, Erik ; BOBERG, Kirsten M. ; SCHREIBER, Stefan: Genome-Wide Association Analysis in Primary Sclerosing

- Cholangitis. In: *Gastroenterology* 138 (2010), mar, Nr. 3, 1102–1111. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.11.046>. – DOI 10.1053/j.gastro.2009.11.046. – ISSN 00165085
- [34] O'MAHONY, Christine A. ; VIERLING, John M.: Etiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis. In: *Semin. Liver Dis.* 26 (2006), feb, Nr. 1, 3–21. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-933559>. – DOI 10.1055/s-2006-933559. – ISBN 0272–8087 (Print)
- [35] TABIBIAN, James H. ; TALWALKAR, Jayant A. ; LINDOR, Keith D.: Role of the microbiota and antibiotics in primary sclerosing cholangitis. In: *Biomed Res. Int.* 2013 (2013), jan, 389537. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/389537>. – DOI 10.1155/2013/389537. – ISSN 2314–6141
- [36] POLLHEIMER, Marion J. ; HALILBASIC, Emina ; FICKERT, Peter ; TRAUNER, Michael: Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis. In: *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 25 (2011), dec, Nr. 6, 727–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2011.10.009>. – DOI 10.1016/j.bpg.2011.10.009. – ISSN 1532–1916
- [37] KATT, Janosch ; SCHWINGE, Dorothee ; SCHOKNECHT, Tanja ; QUAAS, Alexander ; SOBOTKA, Ingo ; BURANDT, Eike ; BECKER, Christoph ; NEURATH, Markus F. ; LOHSE, Ansgar W. ; HERKEL, Johannes ; SCHRAMM, Christoph: Increased T helper type 17 response to pathogen stimulation in patients with primary sclerosing cholangitis. In: *Hepatology* 58 (2013), sep, Nr. 3, 1084–1093. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.26447>. – DOI 10.1002/hep.26447. – ISSN 02709139
- [38] OLSSON, Rolf ; BJÖRNSSON, Einar ; BÄCKMAN, Lars ; FRIMAN, S ; HÖCKERTEDT, K ; KAIJSER, B ; OLAUSSON, M: Bile duct bacterial isolates in primary sclerosing cholangitis: a study of explanted livers. In: *J. Hepatol.* 28 (1998), mar, Nr. 3, 426–32. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827898803164><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9551680>. – ISSN 0168–8278
- [39] MUELLER, Tobias ; BEUTLER, Claudia ; PICÓ, Almudena H. ; SHIBOLET, Oren ; PRATT, Daniel S. ; PASCHER, Andreas ; NEUHAUS, Peter ; WIEDENMANN, Bertram ; BERG, Thomas ; PODOLSKY, Daniel K.: Enhanced innate immune responsiveness and intolerance to intestinal endotoxins in human biliary epithelial cells contributes to chronic cholangitis. In: *Liver Int.* 31 (2011), nov, Nr. 10, 1574–88. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02635.x>. – DOI 10.1111/j.1478-3231.2011.02635.x. – ISBN 2146482508

- [40] TERJUNG, Birgit ; SÖHNE, Jennifer ; LECHTENBERG, Berthold ; GOTTWEIN, Judith ; MUENNICH, Marit ; HERZOG, Volker ; MÄHLER, Michael ; SAUERBRUCH, Tilman ; SPENGLER, Ulrich: p-ANCAs in autoimmune liver disorders recognise human beta-tubulin isotype 5 and cross-react with microbial protein FtsZ. In: *Gut* 59 (2010), Nr. 6, S. 808–816. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2008.157818>. – DOI 10.1136/gut.2008.157818. – ISBN 1468–3288 (Electronic) 1468–3288 (Linking)
- [41] GRANT, Allister J. ; LALOR, Patricia F. ; SALMI, Marko ; JALKANEN, Sirpa ; ADAMS, David H.: Homing of mucosal lymphocytes to the liver in the pathogenesis of hepatic complications of inflammatory bowel disease. In: *Lancet* 359 (2002), Nr. 9301, S. 150–157. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07374-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07374-9). – DOI 10.1016/S0140-6736(02)07374-9. – ISBN 0140–6736 (Print)
- [42] EKSTEEN, Bertus ; GRANT, Allister J. ; MILES, Alice ; CURBISHLEY, Stuart M. ; LALOR, Patricia F. ; HÜBSCHER, Stefan G. ; BRISKIN, Michael ; SALMON, Mike ; ADAMS, David H.: Hepatic endothelial CCL25 mediates the recruitment of CCR9+ gut-homing lymphocytes to the liver in primary sclerosing cholangitis. In: *J. Exp. Med.* 200 (2004), dec, Nr. 11, 1511–7. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20041035>. – DOI 10.1084/jem.20041035. – ISSN 0022–1007
- [43] EKSTEEN, Bertus ; MORA, J. R. ; HAUGHTON, Emma L. ; HENDERSON, Neil C. ; LEE-TURNER, Laura ; VILLABLANCA, Eduardo J. ; CURBISHLEY, Stuart M. ; ASPINALL, Alex I. ; ANDRIAN, Ulrich H. ; ADAMS, David H.: Gut Homing Receptors on CD8 T Cells Are Retinoic Acid Dependent and Not Maintained by Liver Dendritic or Stellate Cells. In: *Gastroenterology* 137 (2009), Nr. 1, 320–329. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.046>. – DOI 10.1053/j.gastro.2009.02.046. – ISBN 1528–0012 (Electronic)\r0016–5085 (Linking)
- [44] GRANT, A. J. ; LALOR, P. F. ; HÜBSCHER, S. G. ; BRISKIN, M. ; ADAMS, D. H.: MAdCAM-1 expressed in chronic inflammatory liver disease supports mucosal lymphocyte adhesion to hepatic endothelium (MAdCAM-1 in chronic inflammatory liver disease). In: *Hepatology* 33 (2001), Nr. 5, S. 1065–1072. <http://dx.doi.org/10.1053/jhep.2001.24231>. – DOI 10.1053/jhep.2001.24231. – ISBN 0270–9139 (Print)\r0270–9139 (Linking)
- [45] ROSMORDUC, Olivier ; HERMELIN, Brigitte ; BOELLE, Pierre-Yves ; POUPON, Renee E. ; POUPON, Raoul ; CHAZOUILLÈRES, Olivier: ABCB4 gene mutations and primary sclerosing cholangitis. In: *Gastroenterology* 126 (2004), apr, Nr. 4, 1220–2; author reply 1222–3. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2004.02.050>. – DOI 10.1053/j.gastro.2004.02.050. – ISSN 0016–5085

- [46] PAULI-MAGNUS, Christiane ; KERB, Reinhold ; FATTINGER, Karin ; LANG, Thomas ; ANWALD, Birgit ; KULLAK-UBLICK, Gerd A. ; BEUERS, Ulrich ; MEIER, Peter J.: BSEP and MDR3 Haplotype Structure in Healthy Caucasians, Primary Biliary Cirrhosis and Primary Sclerosing Cholangitis. In: *Hepatology* 39 (2004), Nr. 3, S. 779–791. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.20159>. – DOI 10.1002/hep.20159. – ISBN 0270–9139 (Print)
- [47] TRAUNER, Michael ; FICKERT, Peter ; WAGNER, Martin: MDR3 (ABCB4) defects: A paradigm for the genetics of adult cholestatic syndromes. In: *Semin. Liver Dis.* 27 (2007), Nr. 1, S. 77–98. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-960172>. – DOI 10.1055/s-2006-960172. – ISBN 0272–8087 (Print)
- [48] LANG, Carmen ; MEIER, Yvonne ; STIEGER, Bruno ; BEUERS, Ulrich ; LANG, Thomas ; KERB, Reinhold ; KULLAK-UBLICK, Gerd a. ; MEIER, Peter J. ; PAULI-MAGNUS, Christiane: Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the multidrug resistance protein 3 associated with drug-induced liver injury. In: *Pharmacogenet. Genomics* 17 (2007), S. 47–60. <http://dx.doi.org/10.1097/01.fpc.0000230418.28091.76>. – DOI 10.1097/01.fpc.0000230418.28091.76. – ISBN 1744–6872 (Print)
- [49] LINDOR, K D.: Ursodiol for primary sclerosing cholangitis. Mayo Primary Sclerosing Cholangitis-Ursodeoxycholic Acid Study Group. In: *N. Engl. J. Med.* 336 (1997), mar, Nr. 10, 691–5. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199703063361003>. – DOI 10.1056/NEJM199703063361003. – ISSN 0028–4793
- [50] OLSSON, Rolf ; BOBERG, Kirsten M. ; MUCKADELL, Ove S. ; LINDGREN, Stefan ; HULTCRANTZ, Rolf ; FOLVIK, Geir ; BELL, Helge ; GANGSØY-KRISTIANSEN, Magnhild ; MATRE, Jon ; RYDNING, Andreas ; WIKMAN, Ola ; DANIELSSON, Ake ; SANDBERG-GERTZÉN, Hanna ; UNG, Kjell-Arne ; ERIKSSON, Anders ; LÖÖF, Lars ; PRYTZ, Hanne ; MARSCHALL, Hanns-Ulrich ; BROOMÉ, Ulrika: High-dose ursodeoxycholic acid in primary sclerosing cholangitis: a 5-year multicenter, randomized, controlled study. In: *Gastroenterology* 129 (2005), nov, Nr. 5, 1464–72. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2005.08.017>. – DOI 10.1053/j.gastro.2005.08.017. – ISSN 0016–5085
- [51] STANICH, Peter P. ; BJÖRNSSON, Einar ; GOSSARD, Andrea a. ; ENDERS, Felicity ; JORGENSEN, Roberta ; LINDOR, Keith D.: Alkaline phosphatase normalization is associated with better prognosis in primary sclerosing cholangitis. In: *Dig. Liver Dis.* 43 (2011), apr, Nr. 4, 309–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2010.12.008>. – DOI 10.1016/j.dld.2010.12.008. – ISSN 1878–3562

- [52] LINDSTRÖM, Lina ; HULTCRANTZ, Rolf ; BOBERG, Kirsten M. ; FRIIS-LIBY, Ingalill ; BERGQUIST, Annika: Association between reduced levels of alkaline phosphatase and survival times of patients with primary sclerosing cholangitis. In: *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 11 (2013), jul, Nr. 7, 841–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2012.12.032>. – DOI 10.1016/j.cgh.2012.12.032. – ISSN 1542–7714
- [53] LINDOR, Keith D. ; KOWDLEY, Kris V. ; LUKETIC, Velimir A C. ; HARRISON, M E. ; MCCASHLAND, Timothy ; BEFELER, Alex S. ; HARNOIS, Denise ; JORGENSEN, Roberta ; PETZ, Jan ; KEACH, Jill ; MOONEY, Jody ; SARGEANT, Carol ; BRAATEN, Julie ; BERNARD, Tamara ; KING, Debra ; MICELI, Ellen ; SCHMOLL, Jeff ; HOSKIN, Tanya ; THAPA, Prabin ; ENDERS, Felicity: High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis. In: *Hepatology* 50 (2009), sep, Nr. 3, 808–14. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.23082>. – DOI 10.1002/hep.23082. – ISSN 1527–3350
- [54] EATON, John E. ; SILVEIRA, Marina G. ; PARDI, Darrell S. ; SINAKOS, Emmanouil ; KOWDLEY, Kris V. ; LUKETIC, Velimir a C. ; HARRISON, M E. ; MCCASHLAND, Timothy ; BEFELER, Alex S. ; HARNOIS, Denise ; JORGENSEN, Roberta ; PETZ, Jan ; LINDOR, Keith D.: High-dose ursodeoxycholic acid is associated with the development of colorectal neoplasia in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. In: *Am. J. Gastroenterol.* 106 (2011), sep, Nr. 9, 1638–45. <http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2011.156>. – DOI 10.1038/ajg.2011.156. – ISSN 1572–0241
- [55] FICKERT, Peter ; WAGNER, Martin ; MARSCHALL, Hanns U. ; FUCHSBICHLER, Andrea ; ZOLLNER, Gernot ; TSYBROVSKYY, Oleksiy ; ZATLOUKAL, Kurt ; LIU, Jie ; WAALKES, Michael P. ; COVER, Cathleen ; DENK, Helmut ; HOFMANN, Alan F. ; JAESCHKE, Hartmut ; TRAUNER, Michael: 24-norUrsodeoxycholic acid is superior to ursodeoxycholic acid in the treatment of sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. In: *Gastroenterology* 130 (2006), Nr. 2, S. 465–481. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2005.10.018>. – DOI 10.1053/j.gastro.2005.10.018. – ISBN 0016–5085
- [56] FICKERT, Peter ; POLLHEIMER, Marion J. ; SILBERT, Dagmar ; MOUSTAFA, Tarek ; HALILBASIC, Emina ; KRONES, Elisabeth ; DURCHSCHEIN, Franziska ; TH??RINGER, Andrea ; ZOLLNER, Gernot ; DENK, Helmut ; TRAUNER, Michael: Differential effects of norUDCA and UDCA in obstructive cholestasis in mice. In: *J. Hepatol.* 58 (2013), Nr. 6, 1201–1208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.01.026>. – DOI 10.1016/j.jhep.2013.01.026. – ISBN 0168–8278

- [57] ALI, Ahmad H. ; CAREY, Elizabeth J. ; LINDOR, Keith D.: Current research on the treatment of primary sclerosing cholangitis. In: *Intractable rare Dis. Res.* 4 (2015), Nr. 1, 1–6. <http://dx.doi.org/10.5582/irdr.2014.01018>. – DOI 10.5582/irdr.2014.01018. – ISSN 2186–3644
- [58] STIEHL, Adolf: Primary sclerosing cholangitis: the role of endoscopic therapy. In: *Semin. Liver Dis.* 26 (2006), mar, Nr. 1, 62–8. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-933564>. – DOI 10.1055/s-2006-933564. – ISSN 0272–8087
- [59] BALUYUT, Arthur R. ; SHERMAN, Stuart ; LEHMAN, Glen A. ; HOEN, Helena ; CHALASANI, Naga: Impact of endoscopic therapy on the survival of patients with primary sclerosing cholangitis. In: *Gastrointest. Endosc.* 53 (2001), mar, Nr. 3, 308–12. <http://dx.doi.org/10.1067/mge.2001/112739>. – DOI 10.1067/mge.2001/112739. – ISSN 0016–5107
- [60] TISCHENDORF, Jens J. W. ; HECKER, Hartmut ; KRÜGER, Martin ; MANNS, Michael P. ; MEIER, Peter N.: Characterization, Outcome, and Prognosis in 273 Patients with Primary Sclerosing Cholangitis: A Single Center Study. In: *Am. J. Gastroenterol.* 102 (2007), jan, Nr. 1, 107–114. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00872.x>. – DOI 10.1111/j.1572-0241.2006.00872.x. – ISSN 0002–9270
- [61] CAMPSEN, Jeffrey ; ZIMMERMAN, Michael A. ; TROTTER, James F. ; WACHS, Michael ; BAK, Thomas ; STEINBERG, Tracy ; KAM, Igal: Clinically recurrent primary sclerosing cholangitis following liver transplantation: a time course. In: *Liver Transpl.* 14 (2008), feb, Nr. 2, 181–5. <http://dx.doi.org/10.1002/lt.21313>. – DOI 10.1002/lt.21313. – ISSN 1527–6465
- [62] NIKOLAUS, Susanna ; SCHREIBER, Stefan: Diagnostics of inflammatory bowel disease. In: *Gastroenterology* 133 (2007), Nr. 5, 1670–89. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2007.09.001>. – DOI 10.1053/j.gastro.2007.09.001. – ISBN 0016–5085
- [63] VAN LIMBERGEN, Johan ; RADFORD-SMITH, Graham ; SATSANGI, Jack: Advances in IBD genetics. In: *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11 (2014), mar, Nr. 6, 372–385. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2014.27>. – DOI 10.1038/nrgastro.2014.27. – ISSN 1759–5045
- [64] ANDERSON, Carl A. ; BOUCHER, Gabrielle ; LEES, Charlie W. ; FRANKE, Andre ; D'AMATO, Mauro ; TAYLOR, Kent D. ; LEE, James C. ; GOYETTE, Philippe ; IMIELINSKI, Marcin ; LATIANO, Anna ; LAGACÉ, Caroline ; SCOTT, Regan ; AMININEJAD, Leila ; BUMPSTEAD, Suzannah ; BAIDOO, Leonard ; BALDASSANO, Robert N. ; BARCLAY, Murray ; BAYLESS, Theodore M. ; BRAND, Stephan ; BÜNING,

- Carsten ; COLOMBEL, Jean-Frédéric ; DENSON, Lee A. ; DE VOS, Martine ; DUBINSKY, Marla ; EDWARDS, Cathryn ; ELLINGHAUS, David ; FEHRMANN, Rudolf S N. ; FLOYD, James A B. ; FLORIN, Timothy ; FRANCHIMONT, Denis ; FRANKKE, Lude ; GEORGES, Michel ; GLAS, Jürgen ; GLAZER, Nicole L. ; GUTHERY, Stephen L. ; HARITUNIANS, Talin ; HAYWARD, Nicholas K. ; HUGOT, Jean-Pierre ; JOBIN, Gilles ; LAUKENS, Debby ; LAWRENCE, Ian ; LÉMANN, Marc ; LEVINE, Arie ; LIBIOULLE, Cecile ; LOUIS, Edouard ; MCGOVERN, Dermot P. ; MILLA, Monica ; MONTGOMERY, Grant W. ; MORLEY, Katherine I. ; MOWAT, Craig ; NG, Aylwin ; NEWMAN, William ; OPHOFF, Roel A. ; PAPI, Laura ; PALMIERI, Orazio ; PEYRIN-BIROULET, Laurent ; PANÉS, Julián ; PHILLIPS, Anne ; PRESCOTT, Natalie J. ; PROCTOR, Deborah D. ; ROBERTS, Rebecca ; RUSSELL, Richard ; RUTGEERTS, Paul ; SANDERSON, Jeremy ; SANS, Miquel ; SCHUMM, Philip ; SEIBOLD, Frank ; SHARMA, Yashoda ; SIMMS, Lisa A. ; SEIELSTAD, Mark ; STEINHART, A H. ; TARGAN, Stephan R. ; BERG, Leonard H. d. ; VATN, Morten ; VERSPAGET, Hein ; WALTERS, Thomas ; WIJMEGA, Cisca ; WILSON, David C. ; WESTRA, Harm-Jan ; XAVIER, Ramnik J. ; ZHAO, Zhen Z. ; PONSIOEN, Cyriel Y. ; ANDERSEN, Vibeke ; TORKVIST, Leif ; GAZOULI, Maria ; ANAGNOU, Nicholas P. ; KARLSEN, Tom H. ; KUPCINSKAS, Limas ; SVENTORAITYTE, Jurgita ; MANSFIELD, John C. ; KUGATHASAN, Subra ; SILVERBERG, Mark S. ; HALFVARSON, Jonas ; ROTTER, Jerome I. ; MATHEW, Christopher G. ; GRIFFITHS, Anne M. ; GEARRY, Richard ; AHMAD, Tariq ; BRANT, Steven R. ; CHAMAILLARD, Mathias ; SATSANGI, Jack ; CHO, Judy H. ; SCHREIBER, Stefan ; DALY, Mark J. ; BARRETT, Jeffrey C. ; PARKES, Miles ; ANNESE, Vito ; HAKONARSON, Hakon ; RADFORD-SMITH, Graham ; DUERR, Richard H. ; VERMEIRE, Séverine ; WEERSMA, Rinse K. ; RIOUX, John D.: Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. In: *Nat. Genet.* 43 (2011), mar, Nr. 3, 246–252. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.764>. – DOI 10.1038/ng.764. – ISBN 1061–4036
- [65] BAUMGART, Daniel C. ; SANDBORN, William J.: Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. In: *Lancet* 369 (2007), Nr. 9573, 1641–57. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60751-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60751-X). – DOI 10.1016/S0140-6736(07)60751-X. – ISBN 1474–547X (Electronic)
- [66] OTT, S J.: Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. In: *Gut* 53 (2004), Nr. 5, 685–693. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2003.025403>. – DOI 10.1136/gut.2003.025403. – ISSN 0017–5749

- [67] LEPAGE, Patricia ; HÄSLER, Robert ; SPEHLMANN, Martina E. ; REHMAN, Ateequr ; ZVIRBLIENE, Aida ; BEGUN, Alexander ; OTT, Stephan ; KUPCINSKAS, Limas ; DORÉ, Joël ; RAEDLER, Andreas ; SCHREIBER, Stefan: Twin Study Indicates Loss of Interaction Between Microbiota and Mucosa of Patients With Ulcerative Colitis. In: *Gastroenterology* 141 (2011), Nr. 1, 227–236. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.011>. – DOI 10.1053/j.gastro.2011.04.011. – ISSN 00165085
- [68] SHEEHAN, Donal ; MORAN, Carthage ; SHANAHAN, Fergus: The microbiota in inflammatory bowel disease. In: *J. Gastroenterol.* 50 (2015), Nr. 5, 495–507. <http://dx.doi.org/10.1007/s00535-015-1064-1>. – DOI 10.1007/s00535-015-1064-1. – ISSN 0944-1174
- [69] SILVERBERG, Mark S. ; SATSANGI, Jack ; AHMAD, Tariq ; ARNOTT, Ian D. ; BERNSTEIN, Charles N. ; BRANT, Steven R. ; CAPRILLI, Renzo ; COLOMBEL, Jean-Frederic ; GASCHE, Christoph ; GEBOES, Karel ; JEWELL, Derek P. ; KARBAN, Amir ; LOFTUS JR, Edward V. ; PEÑA, a S. ; RIDDELL, Robert H. ; SACHAR, David B. ; SCHREIBER, Stefan ; STEINHART, a H. ; TARGAN, Stephan R. ; VERMEIRE, Severine ; WARREN, B F.: Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. In: *Can. J. Gastroenterol.* 19 Suppl A (2005), Nr. September, S. 5–36. – ISBN 0835-7900 (Print) 0835-7900 (Linking)
- [70] BARRAL, Matthias ; DOHAN, Anthony ; ALLEZ, Matthieu ; BOUDIAF, Mourad ; CAMUS, Marine ; LAURENT, Valérie ; HOEFFEL, Christine ; SOYER, Philippe: Gastrointestinal cancers in inflammatory bowel disease: An update with emphasis on imaging findings. In: *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 97 (2015), Nr. August 2015, 30–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.08.005>. – DOI 10.1016/j.critrevonc.2015.08.005. – ISSN 10408428
- [71] MANNINEN, Pia ; KARVONEN, Anna-Liisa ; HUHTALA, Heini ; RASMUSSEN, Martin ; COLLIN, Pekka: The epidemiology of inflammatory bowel diseases in Finland. In: *Scand. J. Gastroenterol.* 45 (2010), Nr. 9, S. 1063–1067. <http://dx.doi.org/10.3109/00365521.2010.485323>. – DOI 10.3109/00365521.2010.485323. – ISSN 1502-7708
- [72] MOLODECKY, Natalie A. ; SOON, Ing S. ; RABI, Doreen M. ; GHALI, William A. ; FERRIS, Mollie ; CHERNOFF, Greg ; BENCHIMOL, Eric I. ; PANACCIONE, Remo ; GHOSH, Subrata ; BARKEMA, Herman W. ; KAPLAN, Gilaad G.: Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. In: *Gastroenterology* 142 (2012), Nr. 1, 46–54.e42. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.011>. – DOI 10.1053/j.gastro.2011.04.011. – ISSN 00165085

- doi.org/10.1053/j.gastro.2011.10.001. – DOI 10.1053/j.gastro.2011.10.001. – ISSN 00165085
- [73] ORHOLM, M ; MUNKHOLM, P ; LANGHOLZ, E ; NIELSEN, O H. ; SØRENSEN, T I. ; BINDER, V: Familial occurrence of inflammatory bowel disease. In: *N. Engl. J. Med.* 324 (1991), jan, Nr. 2, 84–8. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199101103240203>. – DOI 10.1056/NEJM199101103240203. – ISSN 0028–4793
- [74] MONSÉN, U ; BROSTRÖM, O ; NORDENVALL, B ; SÖRSTAD, J ; HELLERS, G: Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with ulcerative colitis. In: *Scand. J. Gastroenterol.* 22 (1987), Nr. 2, 214–8. <http://dx.doi.org/10.3109/00365528708991882>. – DOI 10.3109/00365528708991882. – ISSN 0036–5521
- [75] RUSSEL, M G V M. ; STOCKBRÜGGER, R W.: Epidemiology of inflammatory bowel disease: an update. In: *Scand. J. Gastroenterol.* 31 (1996), Nr. 5, S. 417–427. <http://dx.doi.org/10.3109/00365529609006759>. – DOI 10.3109/00365529609006759
- [76] CALKINS, B M. ; GENERAL, Surgeon ; CALKINS, B M.: A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. In: *Dig. Dis. Sci.* 34 (1989), Nr. 12, 1841–54. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01536701>. – DOI 10.1007/BF01536701. – ISBN 0163–2116 (Print)\r0163–2116 (Linking)
- [77] TUVLIN, Jeffrey A. ; RAZA, Sania S. ; BRACAMONTE, Samuel ; JULIAN, Christina ; HANAUER, Stephen B. ; NICOLAE, Dan L. ; KING, Andrea C. ; CHO, Judy H.: Smoking and inflammatory bowel disease. In: *Inflamm. Bowel Dis.* 13 (2007), Nr. 5, 573–579. <http://dx.doi.org/10.1002/ibd.20043>. – DOI 10.1002/ibd.20043. – ISSN 1078–0998
- [78] BEAUGERIE, Laurent ; MASSOT, Nathalie ; CARBONNEL, Franck ; CATTAN, Stéphane ; GENDRE, Jean P. ; COSNES, Jacques: Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis. In: *Am. J. Gastroenterol.* 96 (2001), Nr. 7, S. 2113–2116. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9270\(01\)02507-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9270(01)02507-2). – DOI 10.1016/S0002–9270(01)02507–2. – ISBN 0002–9270 (Print)\n0002–9270 (Linking)
- [79] COSNES, J ; CARBONNEL, F ; BEAUGERIE, L ; BLAIN, a ; REIJASSE, D ; GENDRE, J-P: Effects of appendicectomy on the course of ulcerative colitis. In: *Gut* 51 (2002), Nr. 6, S. 803–807. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.51.6.803>. – DOI 10.1136/gut.51.6.803. – ISBN 0017–5749 (Print)\r0017–5749 (Linking)
- [80] GRADEL, Kim O. ; NIELSEN, Hans L. ; SCHØNHEYDER, Henrik C. ; EJLERTSEN, Tove ; KRISTENSEN, Brian ; NIELSEN, Henrik: Increased Short- and Long-Term Risk

- of Inflammatory Bowel Disease After Salmonella or Campylobacter Gastroenteritis. In: *Gastroenterology* 137 (2009), Nr. 2, 495–501. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.04.001>. – DOI 10.1053/j.gastro.2009.04.001. – ISBN 1528–0012 (Electronic)\r0016–5085 (Linking)
- [81] PORTER, Chad K. ; TRIBBLE, David R. ; ALIAGA, Pablo a. ; HALVORSON, Heather a. ; RIDDLE, Mark S.: Infectious Gastroenteritis and Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease. In: *Gastroenterology* 135 (2008), Nr. 3, 781–786. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.081>. – DOI 10.1053/j.gastro.2008.05.081. – ISBN 1528–0012 (Electronic)\r0016–5085 (Linking)
- [82] VAN KLINKEN, B J. ; VAN DER WAL, J W. ; EINERHAND, a W. ; BÜLLER, H a. ; DEKKER, J: Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis. In: *Gut* 44 (1999), Nr. 3, S. 387–393. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.44.3.387>. – DOI 10.1136/gut.44.3.387. – ISBN 0017–5749 (Print) 0017–5749 (Linking)
- [83] JOHANSSON, Malin E V. ; GUSTAFSSON, Jenny K. ; HOLMÉN-LARSSON, Jessica ; JABBAR, Karolina S. ; XIA, Lijun ; XU, Hua ; GHISHAN, Fayez K. ; CARVALHO, Frederic A. ; GEWIRTZ, Andrew T. ; SJÖVALL, Henrik ; HANSSON, Gunnar C.: Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. In: *Gut* 63 (2014), feb, Nr. 2, 281–91. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303207>. – DOI 10.1136/gutjnl-2012-303207. – ISBN 1468–3288 (Electronic)\r0017–5749 (Linking)
- [84] HART, Ailsa L. ; AL-HASSI, Hafid O. ; RIGBY, Rachael J. ; BELL, Sally J. ; EMMA-NUEL, Anton V. ; KNIGHT, Stella C. ; KAMM, Michael a. ; STAGG, Andrew J.: Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. In: *Gastroenterology* 129 (2005), Nr. 1, S. 50–65. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.013>. – DOI 10.1053/j.gastro.2005.05.013. – ISBN 0016–5085
- [85] FUSS, Ivan J. ; HELLER, Frank ; BOIRIVANT, Monica ; LEON, Francisco ; YOSHIDA, Masaru ; FICHTNER-FEIGL, Stefan ; YANG, Zhiqiong ; EXLEY, Mark ; KITANI, Atsushi ; BLUMBERG, Richard S. ; MANNON, Peter ; STROBER, Warren: Non-classical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. In: *J. Clin. Invest.* 113 (2004), Nr. 10, 1490–7. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI19836>. – DOI 10.1172/JCI19836. – ISBN 0021–9738 (Print)\r0021–9738 (Linking)
- [86] HELLER, Frank ; FLORIAN, Peter ; BOJARSKI, Christian ; RICHTER, Jan ; CHRIST, Melanie ; HILLENBRAND, Bernd ; MANKERTZ, Joachim ; GITTER, Alfred H. ; BÜR-

- GEL, Nataly ; FROMM, Michael ; ZEITZ, Martin ; FUSS, Ivan ; STROBER, Warren ; SCHULZKE, Jörg D.: Interleukin-13 Is the Key Effector Th2 Cytokine in Ulcerative Colitis That Affects Epithelial Tight Junctions, Apoptosis, and Cell Restitution. In: *Gastroenterology* 129 (2005), Nr. 2, 550–564. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.002>. – DOI 10.1053/j.gastro.2005.05.002. – ISBN 0016–5085 (Print)\r0016–5085 (Linking)
- [87] DIGNASS, a ; PREISS, J C. ; AUST, D E. ; AUTSCHBACH, F ; BALLAUFF, a ; BARRETTON, G ; BOKEMEYER, B ; FICHTNER-FEIGL, S ; HAGEL, S ; HERRLINGER, K R. ; JANTSCHKE, G ; KROESEN, a ; KRUIS, W ; KUCHARZIK, T ; LANGHORST, J ; REINSHAGEN, M ; ROGLER, G ; SCHLEIERMACHER, D ; SCHMIDT, C ; SCHREIBER, S ; SCHULZE, H ; STANGE, E ; ZEITZ, M ; HOFFMANN, J C. ; STALLMACH, a: [Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011]. In: *Z. Gastroenterol.* 49 (2011), Nr. 9, 1276–341. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1281666>. – DOI 10.1055/s-0031-1281666. – ISSN 1439–7803
- [88] FEAGAN, Brian G. ; RUTGEERTS, Paul ; SANDS, Bruce E. ; HANAUER, Stephen ; COLOMBEL, Jean-Frédéric ; SANDBORN, William J. ; VAN ASSCHE, Gert ; AXLER, Jeffrey ; KIM, Hyo-Jong ; DANESE, Silvio ; FOX, Irving ; MILCH, Catherine ; SANKOH, Serap ; WYANT, Tim ; XU, Jing ; PARIKH, Asit ; GEMINI 1 STUDY GROUP: Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. In: *N. Engl. J. Med.* 369 (2013), Nr. 8, 699–710. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1215734>. – DOI 10.1056/NEJMoa1215734. – ISBN 0028–4793
- [89] HOFFMANN, J ; PREISS, J ; AUTSCHBACH, F ; BUHR, H ; HÄUSER, W ; HERRLINGER, K ; HÖHNE, W ; KOLETZKO, S ; KRIEGLSTEIN, C ; KRUIS, W ; MATTHES, H ; MOSER, G ; REINSHAGEN, M ; ROGLER, G ; SCHREIBER, S ; SCHREYER, A ; SIDO, B ; SIEGMUND, B ; STALLMACH, A ; BOKEMEYER, B ; STANGE, E ; ZEITZ, M: S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“. In: *Z. Gastroenterol.* 46 (2008), Nr. 09, 1094–1146. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2008-1027796>. – DOI 10.1055/s-2008-1027796. – ISSN 0044–2771
- [90] BENTLEY, E ; JENKINS, D ; CAMPBELL, F ; WARREN, B: How could pathologists improve the initial diagnosis of colitis? Evidence from an international workshop. In: *J. Clin. Pathol.* 55 (2002), Nr. 12, 955–60. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.55.12.955>. – DOI 10.1136/jcp.55.12.955. – ISSN 0021–9746
- [91] SPEHLMANN, Martina E. ; BEGUN, Alexander Z. ; BURGHARDT, Jens ; LEPAGE, Patricia ; RAEDLER, Andreas ; SCHREIBER, Stefan: Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: Results of a nationwide study. In: *Inflamm.*

- Bowel Dis.* 14 (2008), Nr. 7, S. 968–976. <http://dx.doi.org/10.1002/ibd.20380>. – DOI 10.1002/ibd.20380. – ISBN 1536–4844 (Electronic)\r1078–0998 (Linking)
- [92] BENGTON, May-Bente ; SOLBERG, Camilla ; AAMODT, Geir ; SAUAR, Jostein ; JAHNSEN, Jørgen ; MOUM, Bjørn ; LYGREN, Idar ; VATN, Morten H.: Familial aggregation in Crohn's disease and ulcerative colitis in a Norwegian population-based cohort followed for ten years. In: *J. Crohns. Colitis* 3 (2009), Nr. 2, 92–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crohns.2008.11.002>. – DOI 10.1016/j.crohns.2008.11.002. – ISBN 1876–4479
- [93] BENGTON, May-Bente ; AAMODT, Geir ; VATN, Morten H. ; HARRIS, Jennifer R.: Concordance for IBD among twins compared to ordinary siblings—a Norwegian population-based study. In: *J. Crohns. Colitis* 4 (2010), Nr. 3, 312–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crohns.2009.12.008>. – DOI 10.1016/j.crohns.2009.12.008. – ISSN 1876–4479
- [94] GARCÍA RODRÍGUEZ, Luis A. ; RUIGÓMEZ, Ana ; PANÉS, Julián: Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. In: *Gastroenterology* 130 (2006), Nr. 6, 1588–94. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2006.02.004>. – DOI 10.1053/j.gastro.2006.02.004. – ISBN 0016–5085
- [95] BAUMGART, Daniel C. ; SANDBORN, William J.: Crohn's disease. In: *Lancet* 380 (2012), Nr. 9853, 1590–1605. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60026-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60026-9). – DOI 10.1016/S0140-6736(12)60026-9. – ISBN 978–1–4614–0997–7
- [96] HAMPE, J ; CUTHBERT, a ; CROUCHER, P J. ; MIRZA, M M. ; MASCHERETTI, S ; FISHER, S ; FRENZEL, H ; KING, K ; HASSELMEYER, a ; MACPHERSON, a J. ; BRIDGER, S ; DEVENTER, S van ; FORBES, a ; NIKOLAUS, S ; LENNARD-JONES, J E. ; FOELSCH, U R. ; KRAWCZAK, M ; LEWIS, C ; SCHREIBER, S ; MATHEW, C G.: Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. In: *Lancet* 357 (2001), Nr. 9272, 1925–8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)05063-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)05063-7). – DOI 10.1016/S0140-6736(00)05063-7. – ISBN 0140–6736 (Print)\r0140–6736 (Linking)
- [97] OGURA, Yasunori ; INOHARA, Naohiro ; BENITO, Adalberto ; CHEN, Felicia F. ; YAMAOKA, Shoji ; NÚÑEZ, Gabriel: Nod2, a Nod1/Apaf-1 Family Member That Is Restricted to Monocytes and Activates NF- κ B. In: *J. Biol. Chem.* 276 (2001), Nr. 7, S. 4812–4818. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M008072200>. – DOI 10.1074/jbc.M008072200. – ISBN 0021–9258 (Print)
- [98] WEHKAMP, J ; HARDER, J ; WEICHENTHAL, M ; SCHWAB, M ; SCHÄFFELER, E ; SCHLEE, M ; HERRLINGER, K R. ; STALLMACH, a ; NOACK, F ; FRITZ, P

- ; SCHRÖDER, J M. ; BEVINS, C L. ; FELLERMANN, K ; STANGE, E F.: NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. In: *Gut* 53 (2004), Nr. 11, S. 1658–1664. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2003.032805>. – DOI 10.1136/gut.2003.032805. – ISBN 0017–5749 (Print)\r0017–5749 (Linking)
- [99] MONDOT, S. ; BARREAU, F. ; AL NABHANI, Z. ; DUSSAILLANT, M. ; LE ROUX, K. ; DORE, J. ; LECLERC, M. ; HUGOT, J.-P. ; LEPAGE, P.: Altered gut microbiota composition in immune-impaired Nod2^{-/-} mice. In: *Gut* 61 (2012), apr, Nr. 4, 634–635. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300478>. – DOI 10.1136/gutjnl-2011-300478. – ISBN 0017–5749
- [100] ALDHOUS, Marian C. ; SOO, Kimberley ; STARK, Lesley a. ; ULANICKA, Agata a. ; EASTERBROOK, Jennifer E. ; DUNLOP, Malcolm G. ; SATSANGI, Jack: Cigarette smoke extract (CSE) delays NOD2 expression and affects NOD2/RIPK2 interactions in intestinal epithelial cells. In: *PLoS One* 6 (2011), Nr. 9, e24715. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024715>. – DOI 10.1371/journal.pone.0024715. – ISSN 1932–6203
- [101] CADWELL, Ken ; LIU, John Y. ; BROWN, Sarah L. ; MIYOSHI, Hiroyuki ; LOH, Joy ; LENNERZ, Jochen K. ; KISHI, Chieko ; KC, Wumesh ; CARRERO, Javier A. ; HUNT, Steven ; STONE, Christian D. ; BRUNT, Elizabeth M. ; XAVIER, Ramnik J. ; SLECKMAN, Barry P. ; LI, Ellen ; MIZUSHIMA, Noboru ; STAPPENBECK, Thaddeus S. ; VIRGIN, Herbert W.: A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. In: *Nature* 456 (2008), Nr. 7219, 259–63. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07416>. – DOI 10.1038/nature07416. – ISBN 1476–4687 (Electronic)\r0028–0836 (Linking)
- [102] NIESS, Jan H. ; BRAND, Stephan ; GU, Xiubin ; LANDSMAN, Limor ; JUNG, Steffen ; MCCORMICK, Beth A. ; VYAS, Jatin M. ; BOES, Marianne ; PLOEGH, Hidde L. ; FOX, James G. ; LITTMAN, Dan R. ; REINECKER, Hans-Christian: CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. In: *Science* 307 (2005), Nr. 5707, S. 254–258. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1102901>. – DOI 10.1126/science.1102901. – ISBN 1095–9203 (Electronic)\r0036–8075 (Linking)
- [103] BAUMGART, D C. ; METZKE, D ; GUCKELBERGER, O ; PASCHER, a ; GRÖTZINGER, C ; PRZESDZING, I ; DÖRFFEL, Y ; SCHMITZ, J ; THOMAS, S: Aberrant plasmacytoid dendritic cell distribution and function in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. In: *Clin. Exp. Immunol.* 166 (2011), S. 46–54. <http://dx.doi.org/>

- 10.1111/j.1365-2249.2011.04439.x. – DOI 10.1111/j.1365-2249.2011.04439.x. – ISBN 1365-2249 (Electronic)\r0009-9104 (Linking)
- [104] BAUMGART, D C. ; METZKE, D ; SCHMITZ, J ; SCHEFFOLD, A ; STURM, A ; WIEDENMANN, B ; DIGNASS, A U.: Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. In: *Gut* 54 (2005), Nr. 2, 228–36. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2004.040360>. – DOI 10.1136/gut.2004.040360. – ISBN 0017-5749 (Print)
- [105] ILIEV, I D. ; SPADONI, I ; MILETI, E ; MATTEOLI, G ; SONZOGNI, a ; SAMPIETRO, G M. ; FOSCHI, D ; CAPRIOLI, F ; VIALE, G ; RESCIGNO, M: Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. In: *Gut* 58 (2009), Nr. 11, S. 1481–1489. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2008.175166>. – DOI 10.1136/gut.2008.175166. – ISBN 00175749 (ISSN)
- [106] HIMMEL, Megan E. ; YAO, Yu ; ORBAN, Paul C. ; STEINER, Theodore S. ; LEVINGS, Megan K.: Regulatory T-cell therapy for inflammatory bowel disease: more questions than answers. In: *Immunology* 136 (2012), Nr. 2, 115–122. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2567.2012.03572.x>. – DOI 10.1111/j.1365-2567.2012.03572.x. – ISSN 00192805
- [107] PREISS, J C. ; BOKEMEYER, B ; BUHR, H J. ; DIGNASS, A ; HÄUSER, W ; HARTMANN, F ; KUCHARZIK, T.: Aktualisierte S3-Leitlinie „ Diagnostik und Therapie des M . Crohn “. In: *Z. Gastroenterol.* 52 (2014), Nr. 12, S. 1431–1484. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1385199>. – DOI 10.1055/s-0034-1385199
- [108] SANDBORN, William J. ; FEAGAN, BG ; RUTGEERTS, Paul ; HANAUER, Stephen ; COLOMBEL, Jean-Frédéric ; SANDS, Bruce E. ; LUKAS, Milan ; FEDORAK, Richard N. ; LEE, Scott ; BRESSLER, Brian ; FOX, Irving ; ROSARIO, Maria ; SANKOH, Serap ; XU, Jing ; STEPHENS, Kristin ; MILCH, Catherine ; PARIKH, Asit ; GEMINI 2 STUDY GROUP: Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn’s disease. In: *N. Engl. J. Med.* 369 (2013), Nr. 8, 711–21. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1215739>. – DOI 10.1056/NEJMoa1215739. – ISBN 0028-4793
- [109] SANDBORN, William J. ; FEAGAN, Brian G. ; FEDORAK, Richard N. ; SCHERL, Ellen ; FLEISHER, Mark R. ; KATZ, Seymour ; JOHANNIS, Jewel ; BLANK, Marion ; RUTGEERTS, Paul: A Randomized Trial of Ustekinumab, a Human Interleukin-12/23 Monoclonal Antibody, in Patients With Moderate-to-Severe Crohn’s Disease. In: *Gastroenterology* 135 (2008), Nr. 4, S. 1130–1141. <http://dx.doi.org/10.1056/GI.2008.03.001>. – DOI 10.1056/GI.2008.03.001. – ISSN 0016-2975

- 1053/j.gastro.2008.07.014. – DOI 10.1053/j.gastro.2008.07.014. – ISBN 1528–0012 (Electronic)\r0016–5085 (Linking)
- [110] FICKERT, Peter ; POLLHEIMER, Marion J. ; BEUERS, Ulrich ; LACKNER, Carolin ; HIRSCHFIELD, Gideon ; HOUSSET, Chantal ; KEITEL, Verena ; SCHRAMM, Christoph ; MARSCHALL, Hanns-Ulrich ; KARLSEN, Tom H. ; MELUM, Espen ; KASER, Arthur ; EKSTEEN, Bertus ; STRAZZABOSCO, Mario ; MANNS, Michael ; TRAUNER, Michael: Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC). In: *J. Hepatol.* 60 (2014), jun, Nr. 6, 1290–303. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.02.006>. – DOI 10.1016/j.jhep.2014.02.006. – ISSN 1600–0641
- [111] SALEH, Maya ; ELSON, Charles O.: Experimental inflammatory bowel disease: insights into the host-microbiota dialog. In: *Immunity* 34 (2011), mar, Nr. 3, 293–302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.008>. – DOI 10.1016/j.immuni.2011.03.008. – ISSN 1097–4180
- [112] LOW, Daren ; NGUYEN, Deanna D. ; MIZOGUCHI, Emiko: Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. In: *Drug Des. Devel. Ther.* 7 (2013), 1341–57. <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S40107>. – DOI 10.2147/DDDT.S40107. – ISSN 1177–8881
- [113] SMIT, J J. ; SCHINKEL, a H. ; OUDE ELFERINK, R P. ; GROEN, a K. ; WAGENAAR, E ; DEEMTER, L van ; MOL, C a. ; OTTENHOFF, R ; LUGT, N M. d. ; ROON, M a.: Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. In: *Cell* 75 (1993), nov, Nr. 3, 451–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8106172>. – ISSN 0092–8674
- [114] FICKERT, Peter ; FUCHSBICHLER, Andrea ; WAGNER, Martin ; ZOLLNER, Gernot ; KASER, Arthur ; TILG, Herbert ; KRAUSE, Robert ; LAMMERT, Frank ; LANGNER, Cord ; ZATLOUKAL, Kurt ; MARSCHALL, Hanns-Ulrich ; DENK, Helmut ; TRAUNER, Michael: Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. In: *Gastroenterology* 127 (2004), jul, Nr. 1, 261–274. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.009>. – DOI 10.1053/j.gastro.2004.04.009. – ISSN 00165085
- [115] TABIBIAN, James H. ; O’HARA, Steven P. ; TRUSSONI, Christy E. ; TIETZ, Pamela S. ; SPLINTER, Patrick L. ; MOUNAJJED, Taofic ; HAGEY, Lee R. ; LARUSSO, Nicholas F.: Absence of the intestinal microbiota exacerbates hepatobiliary disease in a murine model of primary sclerosing cholangitis. In: *Hepatology* 63 (2016), jan, Nr.

- 1, 185–196. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.27927>. – DOI 10.1002/hep.27927. – ISSN 02709139
- [116] OKAYASU, Isao ; HATAKEYAMA, Shigeru ; YAMADA, Masahiro ; OHKUSA, Toshifumi ; INAGAKI, Yoshio ; NAKAYA, Rintaro: A Novel Method in the Induction of Reliable Experimental Acute and Chronic Ulcerative Colitis in Mice. In: *Gastroenterology* 98 (1990), S. 694–702. [http://dx.doi.org/S0016508590000725\[pil\]](http://dx.doi.org/S0016508590000725[pil]). – DOI S0016508590000725 [pii]. – ISBN 0016–5085 (Print)\r0016–5085 (Linking)
- [117] PERŠE, Martina ; CERAR, Anton: Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. In: *J. Biomed. Biotechnol.* 2012 (2012), jan, 718617. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/718617>. – DOI 10.1155/2012/718617. – ISSN 1110–7251
- [118] PORITZ, Lisa S. ; GARVER, Kristian I. ; GREEN, Cecelia ; FITZPATRICK, Leo ; RUGGIERO, Francesca ; KOLTUN, Walter a.: Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. In: *J. Surg. Res.* 140 (2007), Nr. 1, 12–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2006.07.050>. – DOI 10.1016/j.jss.2006.07.050. – ISBN 0022–4804 (Print)\r0022–4804 (Linking)
- [119] LAROUÏ, Hamed ; INGERSOLL, Sarah a. ; LIU, Hong C. ; BAKER, Mark T. ; AYYADURAI, Saravanan ; CHARANIA, Moiz a. ; LAROUÏ, Famina ; YAN, Yutao ; SITARAMAN, Shanthi V. ; MERLIN, Didier: Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. In: *PLoS One* 7 (2012), jan, Nr. 3, e32084. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0032084>. – DOI 10.1371/journal.pone.0032084. – ISSN 1932–6203
- [120] JOHANSSON, Malin E V. ; GUSTAFSSON, Jenny K. ; SJÖBERG, Karolina E. ; PETERSSON, Joel ; HOLM, Lena ; SJÖVALL, Henrik ; HANSSON, Gunnar C.: Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. In: *PLoS One* 5 (2010), Nr. 8, e12238. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012238>. – DOI 10.1371/journal.pone.0012238. – ISBN 1932–6203 (Electronic)\n1932–6203 (Linking)
- [121] AXELSSON, L G. ; LANDSTROM, E ; GOLDSCHMIDT, T J. ; GRONBERG, A ; BYLUND-FELLENÏUS, A C.: Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK- cell depleted SCID mice. In: *Inflamm Res* 45 (1996), Nr. 4, S. 181–191
- [122] HALL, Lindsay J. ; FAIVRE, Emilie ; QUINLAN, Aoife ; SHANAHAN, Fergus ; NALLY, Kenneth ; MELGAR, Silvia: Induction and activation of adaptive immune populations during acute and chronic phases of a murine model of experimental colitis.

- In: *Dig. Dis. Sci.* 56 (2011), jan, Nr. 1, 79–89. <http://dx.doi.org/10.1007/s10620-010-1240-3>. – DOI 10.1007/s10620-010-1240-3. – ISSN 1573-2568
- [123] KITAJIMA, S ; TAKUMA, S ; MORIMOTO, M: Tissue distribution of dextran sulfate sodium (DSS) in the acute phase of murine DSS-induced colitis. In: *J. Vet. Med. Sci.* 61 (1999), jan, Nr. 1, 67–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10027168>. – ISSN 0916-7250
- [124] OSTANIN, Dmitry V. ; BAO, Jianxiong ; KOBOZIEV, Iurii ; GRAY, Laura ; ROBINSON-JACKSON, Sherry a. ; KOSLOSKI-DAVIDSON, Melissa ; PRICE, V H. ; GRISHAM, Matthew B.: T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade. In: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296 (2009), feb, Nr. 2, G135–46. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.90462.2008>. – DOI 10.1152/ajpgi.90462.2008. – ISSN 0193-1857
- [125] HARBOUR, Stacey N. ; MAYNARD, Craig L. ; ZINDL, Carlene L. ; SCHOEB, Trenton R. ; WEAVER, Casey T.: Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015), Nr. 22, 201415675. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1415675112>. – DOI 10.1073/pnas.1415675112. – ISBN 1415675112
- [126] NUMATA, Yoshihiro ; TAZUMA, Susumu ; NISHIOKA, Tomoji ; UENO, Yoshitaka ; CHAYAMA, Kazuaki: Immune response in mouse experimental cholangitis associated with colitis induced by dextran sulfate sodium. In: *J. Gastroenterol. Hepatol.* 19 (2004), aug, Nr. 8, 910–5. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1746.2003.03333.x>. – DOI 10.1111/j.1440-1746.2003.03333.x. – ISSN 0815-9319
- [127] JAHNEL, Jörg ; FICKERT, Peter ; LANGNER, Cord ; HÖGENAUER, Christoph ; SILBERT, Dagmar ; GUMHOLD, Judith ; FUCHSBICHLER, Andrea ; TRAUNER, Michael: Impact of experimental colitis on hepatobiliary transporter expression and bile duct injury in mice. In: *Liver Int.* 29 (2009), oct, Nr. 9, 1316–25. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1478-3231.2009.02044.x>. – DOI 10.1111/j.1478-3231.2009.02044.x. – ISSN 1478-3231
- [128] SEIDEL, Daniel ; EICKMEIER, Ira ; KÜHL, Anja a. ; HAMANN, Alf ; LODDENKEMPER, Christoph ; SCHOTT, Eckart: CD8 T cells primed in the gut-associated lymphoid tissue induce immune-mediated cholangitis in mice. In: *Hepatology* 59 (2014), Nr. 2, S. 601–611. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.26702>. – DOI 10.1002/hep.26702. – ISSN 02709139
- [129] MILTENYI, S ; MÜLLER, W ; WEICHEL, W ; RADBRUCH, a: High gradient magnetic cell separation with MACS. In: *Cytometry* 11 (1990), jan, Nr. 2, 231–8. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.1002>. – DOI 10.1002/cyto.1002. – ISSN 0098-2841

- [//dx.doi.org/10.1002/cyto.990110203](http://dx.doi.org/10.1002/cyto.990110203). – DOI 10.1002/cyto.990110203. – ISSN 0196–4763
- [130] LIASKOU, Evaggelia ; WILSON, Daisy V. ; OO, Ye H.: Innate immune cells in liver inflammation. In: *Mediators Inflamm.* 2012 (2012), jan, 949157. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/949157>. – DOI 10.1155/2012/949157. – ISSN 1466–1861
- [131] BOGDANOS, Dimitrios P. ; GAO, Bin ; GERSHWIN, M. E.: Liver immunology. In: *Compr. Physiol.* 3 (2013), Nr. 2, S. 567–598. <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c120011>. – DOI 10.1002/cphy.c120011. – ISBN 9781437714548
- [132] NEMETH, Eszter ; BAIRD, Alan W. ; O'FARRELLY, Cliona: Microanatomy of the liver immune system. In: *Semin. Immunopathol.* 31 (2009), sep, Nr. 3, 333–43. <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-009-0173-4>. – DOI 10.1007/s00281-009-0173-4. – ISSN 1863–2300
- [133] KUMAR, Vipin: NKT-cell subsets: Promoters and protectors in inflammatory liver disease. In: *J. Hepatol.* 59 (2013), Nr. 3, 618–620. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.02.032>. – DOI 10.1016/j.jhep.2013.02.032. – ISBN 8585973870
- [134] GAO, Bin ; JEONG, Won-Il ; TIAN, Zhigang: Liver: An organ with predominant innate immunity. In: *Hepatology* 47 (2008), feb, Nr. 2, 729–36. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.22034>. – DOI 10.1002/hep.22034. – ISSN 1527–3350
- [135] DALEY, Jean M. ; THOMAY, Alan a. ; CONNOLLY, Michael D. ; REICHNER, Jonathan S. ; ALBINA, Jorge E.: Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. In: *J. Leukoc. Biol.* 83 (2008), jan, Nr. 1, 64–70. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0407247>. – DOI 10.1189/jlb.0407247. – ISSN 0741–5400
- [136] MERAD, Miriam ; SATHE, Priyanka ; HELFT, Julie ; MILLER, Jennifer ; MORTHA, Arthur: The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. In: *Annu. Rev. Immunol.* 31 (2013), 563–604. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950>. – DOI 10.1146/annurev-immunol-020711-074950. – ISBN 1545–3278 (Electronic)\r0732–0582 (Linking)
- [137] GUILLIAMS, Martin ; LAAR, Lianne van d.: A Hitchhiker's Guide to Myeloid Cell Subsets: Practical Implementation of a Novel Mononuclear Phagocyte Classification System. In: *Front. Immunol.* 6 (2015), Nr. August, 406. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00406>. – DOI 10.3389/fimmu.2015.00406. – ISBN 1664–3224

- [138] SHI, Chao ; PAMER, Eric G.: Monocyte recruitment during infection and inflammation. In: *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011), nov, Nr. 11, 762–74. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3070>. – DOI 10.1038/nri3070. – ISSN 1474–1741
- [139] CHAN, J.K. C.: The Wonderful Colors of the Hematoxylin–Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology. In: *Int. J. Surg. Pathol.* 22(1) (2014), 12–32. <http://dx.doi.org/10.1177/1066896913517939>. – DOI 10.1177/1066896913517939. – ISBN 1066–8969
- [140] HARTMANN, G ; BIDLINGMAIER, C ; SIEGMUND, B ; ALBRICH, S ; SCHULZE, J ; TSCHOEP, K ; EIGLER, a ; LEHR, H a. ; ENDRES, S: Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292 (2000), jan, Nr. 1, 22–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10604928>. – ISSN 0022–3565
- [141] LONGERICH, T ; FLECHTENMACHER, C ; SCHIRMACHER, P: Quality and quantity in hepatopathology. Diagnostic and clinically relevant grading for non-tumourous liver diseases. In: *Pathologe* 29 (2008), feb, Nr. 1, 15–26. <http://dx.doi.org/10.1007/s00292-007-0963-1>. – DOI 10.1007/s00292-007-0963-1. – ISBN 0029200709
- [142] KERR, T ; CIORBA, M ; MATSUMOTO, H ; DAVIS, V ; LUO, J ; KENNEDY, S ; XIE, Y ; SHAKER, A ; DIECKGRAEFE, B ; DAVIDSON, N: Dextran Sodium Sulfate Inhibition of Real-Time PCR Amplification : A Poly-A Purification Solution. In: *Inflamm. Bowel Dis.* 18 (2012), Nr. 2, S. 344–348. <http://dx.doi.org/10.1002/ibd.21763>. – DOI 10.1002/ibd.21763.Dextran
- [143] LIMDI, J K.: Evaluation of abnormal liver function tests. In: *Postgrad. Med. J.* 79 (2003), jun, Nr. 932, 307–312. <http://dx.doi.org/10.1136/pmj.79.932.307>. – DOI 10.1136/pmj.79.932.307. – ISSN 0032–5473
- [144] KOLACZKOWSKA, Elzbieta ; KUBES, Paul: Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. In: *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013), feb, Nr. 3, 159–175. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3399>. – DOI 10.1038/nri3399. – ISSN 1474–1733
- [145] HÄGER, M. ; COWLAND, J. B. ; BORREGAARD, N.: Neutrophil granules in health and disease. In: *J. Intern. Med.* 268 (2010), Nr. 1, S. 25–34. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2010.02237.x>. – DOI 10.1111/j.1365–2796.2010.02237.x. – ISBN 1365–2796 (Electronic)\r0954–6820 (Linking)
- [146] BORREGAARD, Niels: Neutrophils, from Marrow to Microbes. In: *Immunity* 33 (2010), Nr. 5, 657–670. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>. –

- DOI 10.1016/j.immuni.2010.11.011. – ISBN 1097–4180 (Electronic)\n1074–7613 (Linking)
- [147] GREGORY, Stephen H. ; WING, Edward J.: Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections. In: *J. Leukoc. Biol.* 72 (2002), Nr. August, S. 239–248. – ISBN 0741–5400 (Print)
- [148] SOEHNLEIN, O. ; KENNE, E. ; ROTZIUS, P. ; ERIKSSON, E. E. ; LINDBOM, L.: Neutrophil secretion products regulate anti-bacterial activity in monocytes and macrophages. In: *Clin. Exp. Immunol.* 151 (2008), jan, Nr. 1, 139–45. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03532.x>. – DOI 10.1111/j.1365-2249.2007.03532.x. – ISBN 1365–2249 (Electronic)\r0009–9104 (Linking)
- [149] GREGORY, Stephen H. ; SAGNIMENI, Athanasia J. ; WING, Edward J.: Bacteria in the Bloodstream Are Trapped in the Liver and Killed by Immigrating Neutrophils. In: *J. Immunol.* 6 (1996), Nr. 157, S. 2514–2520
- [150] McDONALD, Braedon ; KUBES, Paul: Neutrophils and intravascular immunity in the liver during infection and sterile inflammation. In: *Toxicol. Pathol.* 40 (2012), Nr. 2, 157–65. <http://dx.doi.org/10.1177/0192623311427570>. – DOI 10.1177/0192623311427570. – ISBN 0192623311
- [151] TACKE, Frank: Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo. In: *Fibrogenesis Tissue Repair* 5 (2012), jul, Nr. Suppl 1, S27. <http://dx.doi.org/10.1186/1755-1536-5-S1-S27>. – DOI 10.1186/1755-1536-5-S1-S27. – ISSN 1755–1536
- [152] SERBINA, Natalya V. ; JIA, Ting ; HOHL, Tobias M. ; PAMER, Eric G.: Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. In: *Annu. Rev. Immunol.* 26 (2008), 421–52. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326>. – DOI 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326. – ISBN 0732–0582 (Print)\n0732–0582 (Linking)
- [153] ZIGMOND, Ehud ; SAMIA-GRINBERG, Shany ; PASMNIK-CHOR, Metsada ; BRAZOWSKI, Eli ; SHIBOLET, Oren ; HALPERN, Zamir ; VAROL, Chen: Infiltrating Monocyte-Derived Macrophages and Resident Kupffer Cells Display Different Ontogeny and Functions in Acute Liver Injury. In: *J. Immunol.* (2014), 1400574. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1400574>. – DOI 10.4049/jimmunol.1400574. – ISBN 1550–6606 (Electronic)\r0022–1767 (Linking)
- [154] DAL-SECCO, Daniela ; WANG, Jing ; ZENG, Zhutian ; KOLACZKOWSKA, Elzbieta ; WONG, Connie H Y. ; PETRI, Björn ; RANSOHOFF, Richard M. ; CHARO, Israel F.

- ; JENNE, Craig N. ; KUBES, Paul: A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury. In: *J. Exp. Med.* 212 (2015), Nr. 4, 447–56. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20141539>. – DOI 10.1084/jem.20141539. – ISSN 1540–9538
- [155] MIKAMI, Yohei ; MIZUNO, Shinta ; NAKAMOTO, Nobuhiro ; HAYASHI, Atsushi ; SUJINO, Tomohisa ; SATO, Toshiro ; KAMADA, Nobuhiko ; MATSUOKA, Katsuyoshi ; HISAMATSU, Tadakazu ; EBINUMA, Hirotoshi ; HIBI, Toshifumi ; YOSHIMURA, Akihiko ; KANAI, Takanori: Macrophages and dendritic cells emerge in the liver during intestinal inflammation and predispose the liver to inflammation. In: *PLoS One* 9 (2014), Nr. 1, S. 1–11. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084619>. – DOI 10.1371/journal.pone.0084619. – ISBN 1932–6203 (Electronic)\r1932–6203 (Linking)
- [156] TRIVEDI, P. P. ; JENA, G. B.: Ulcerative colitis-induced hepatic damage in mice: Studies on inflammation, fibrosis, oxidative DNA damage and GST-P expression. In: *Chem. Biol. Interact.* 201 (2013), Nr. 1-3, 19–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2012.12.004>. – DOI 10.1016/j.cbi.2012.12.004. – ISBN 1872–7786 (Electronic)\r0009–2797 (Linking)
- [157] AXELSSON, L ; MIDTVEDTS, T ; BYLUND-FELLENIS, A-C: The Role of Intestinal Bacteria , Bacterial Translocation and Endotoxin in Dextran Sodium Sulphate-Induced Colitis in the Mouse. In: *Microb. Ecol. Health Dis.* 9 (1996), S. 225–237
- [158] HÅKANSSON, Asa ; BRÄNNING, Camilla ; MOLIN, Göran ; ADAWI, Diya ; HAGSLÄTT, Marie-Louise ; JEPPSSON, Bengt ; NYMAN, Margareta ; AHRNÉ, Siv: Blueberry husks and probiotics attenuate colorectal inflammation and oncogenesis, and liver injuries in rats exposed to cycling DSS-treatment. In: *PLoS One* 7 (2012), jan, Nr. 3, e33510. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033510>. – DOI 10.1371/journal.pone.0033510. – ISSN 1932–6203
- [159] ANDRADE, M. E. R. ; SANTOS, R. d. G. C. d. ; SOARES, A. D. N. ; COSTA, K. A. ; FERNANDES, S. O. A. ; SOUZA, C. M. ; CASSALI, G. D. ; SOUZA, A. L. ; FARIA, A. M. C. ; CARDOSO, V. N.: Pretreatment and Treatment With L-Arginine Attenuate Weight Loss and Bacterial Translocation in Dextran Sulfate Sodium Colitis. In: *J. Parenter. Enter. Nutr.* (2015). <http://dx.doi.org/10.1177/0148607115581374>. – DOI 10.1177/0148607115581374. – ISSN 0148–6071
- [160] GÄBELE, Erwin ; DOSTERT, Karin ; HOFMANN, Claudia ; WIEST, Reiner ; SCHÖLMERICH, Jürgen ; HELLERBRAND, Claus ; OBERMEIER, Florian: DSS induced

- colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH. In: *J. Hepatol.* 55 (2011), dec, Nr. 6, 1391–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.035>. – DOI 10.1016/j.jhep.2011.02.035. – ISSN 1600–0641
- [161] FUKATA, Masayuki ; MICHELSEN, Kathrin S. ; ERI, Rajaraman ; THOMAS, Lisa S. ; HU, Bing ; LUKASEK, Katie ; NAST, Cynthia C. ; LECHAGO, Juan ; XU, Ruliang ; NAIKI, Yoshikazu ; SOLIMAN, Antoine ; ARDITI, Moshe ; ABREU, Maria T.: Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. In: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288 (2005), Nr. 5, S. G1055–G1065. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00328.2004>. – DOI 10.1152/ajpgi.00328.2004. – ISBN 0193–1857 (Print)\n0193–1857 (Linking)
- [162] BLEICH, André ; HANSEN, Axel K.: Time to include the gut microbiota in the hygienic standardisation of laboratory rodents. In: *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35 (2012), Nr. 2, 81–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2011.12.006>. – DOI 10.1016/j.cimid.2011.12.006. – ISBN 1878–1667 (Electronic)\r0147–9571 (Linking)
- [163] ECKBURG, P. B.: Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. In: *Science (80-. .)* 308 (2005), jun, Nr. 5728, 1635–1638. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1110591>. – DOI 10.1126/science.1110591. – ISBN 9780470114735
- [164] SELLON, Rance K. ; TONKONOGY, Susan ; SCHULTZ, Michael ; DIELEMAN, Levinus A. ; GRENTHER, Wetonia ; BALISH, Ed ; RENNICK, Donna M. ; SARTOR, R. B.: Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. In: *Infect. Immun.* 66 (1998), Nr. 11, S. 5224–5231. – ISBN 0019–9567 (Print)\n0019–9567 (Linking)
- [165] ROUND, June L. ; MAZMANIAN, Sarkis K.: The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. In: *Nat. Rev Immunol.* 9 (2009), Nr. May, S. 313–324. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2515>. – DOI 10.1038/nri2515. – ISBN 1474–1741
- [166] HOOPER, Lora V. ; LITTMAN, Dan R. ; MACPHERSON, Andrew J. ; PROGRAM, Molecular P.: Interactions between the microbiota and the immune system. 336 (2015), Nr. 6086, S. 1268–1273. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1223490>. Interactions. – DOI 10.1126/science.1223490.Interactions
- [167] HUDCOVIC, T ; STPÁNKOVÁ, R ; CEBRA, J ; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H: The role of microflora in the development of intestinal inflammation: acute and chronic

- colitis induced by dextran sulfate in germ-free and conventionally reared immunocompetent and immunodeficient mice. In: *Folia Microbiol. (Praha)*. 46 (2001), jan, Nr. 6, 565–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11898350>. – ISSN 0015–5632
- [168] KITAJIMA, S ; MORIMOTO, M ; SAGARA, E ; SHIMIZU, C ; IKEDA, Y: Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IQI/Jic mice. In: *Exp. Anim.* 50 (2001), oct, Nr. 5, 387–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11769541>. – ISSN 1341–1357
- [169] BYLUND-FELLENUS, A. C. ; LANDSTRÖM, E ; AXELSSON, L. G. ; MIDTVEDT, T: Experimental Colitis Induced by Dextran Sulphate in Normal and Germfree Mice. In: *Microb. Ecol. Health Dis.* 7 (1994), jan, Nr. 4, 207–215. <http://dx.doi.org/10.3109/08910609409141356>. – DOI 10.3109/08910609409141356. – ISBN 2000035000
- [170] PILS, Marina C. ; BLEICH, André ; PRINZ, Immo ; FASNACHT, Nicolas ; BOLLATI-FOGOLIN, Mariela ; SCHIPPERS, Angela ; ROZELL, Björn ; MÜLLER, Werner: Commensal gut flora reduces susceptibility to experimentally induced colitis via T-cell-derived interleukin-10. In: *Inflamm. Bowel Dis.* 17 (2011), oct, Nr. 10, 2038–46. <http://dx.doi.org/10.1002/ibd.21587>. – DOI 10.1002/ibd.21587. – ISSN 1536–4844
- [171] MASLOWSKI, Kendle M. ; VIEIRA, Angelica T. ; NG, Aylwin ; KRANICH, Jan ; SIERRO, Frederic ; YU, Di ; SCHILTER, Heidi C. ; ROLPH, Michael S. ; MACKAY, Fabienne ; ARTIS, David ; XAVIER, Ramnik J. ; TEIXEIRA, Mauro M. ; MACKAY, Charles R.: Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. In: *Nature* 461 (2009), oct, Nr. 7268, 1282–6. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08530>. – DOI 10.1038/nature08530. – ISSN 1476–4687
- [172] SCOTT, Jeffrey R. ; FOX-ROBICHAUD, Alison E.: Hepatic leukocyte recruitment in a model of acute colitis. In: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283 (2002), sep, Nr. 3, G561–6. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00462.2001>. – DOI 10.1152/ajpgi.00462.2001. – ISBN 0193–1857 (Print)\r0193–1857 (Linking)
- [173] SEBODE, Marcial ; PEISELER, Moritz ; FRANKE, Björn ; SCHWINGE, Dorothee ; SCHOKNECHT, Tanja ; WORTMANN, Frederike ; QUAAS, Alexander ; PETERSEN, Britt-Sabina ; ELLINGHAUS, Eva ; BARON, Udo ; OLEK, Sven ; WIEGARD, Christiane ; WEILER-NORMANN, Christina ; LOHSE, Ansgar W. ; HERKEL, Johannes ;

- SCHRAMM, Christoph: Reduced FOXP3 + regulatory T cells in patients with primary sclerosing cholangitis are associated with IL2RA gene polymorphisms. In: *J. Hepatol.* 60 (2014), may, Nr. 5, 1010–1016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.12.027>. – DOI 10.1016/j.jhep.2013.12.027. – ISSN 0168–8278
- [174] PELLICORO, Antonella ; RAMACHANDRAN, Prakash ; IREDALE, John P. ; FALLOWFIELD, Jonathan A.: Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. In: *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014), Nr. 3, 181–194. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3623>. – DOI 10.1038/nri3623. – ISSN 1474–1733
- [175] KARLMARK, Karlin R. ; WEISKIRCHEN, Ralf ; ZIMMERMANN, Henning W. ; GASSLER, Nikolaus ; GINHOUX, Florent ; WEBER, Christian ; MERAD, Miriam ; LUEDDE, Tom ; TRAUTWEIN, Christian ; TACKE, Frank: Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. In: *Hepatology* 50 (2009), jul, Nr. 1, 261–74. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.22950>. – DOI 10.1002/hep.22950. – ISSN 1527–3350
- [176] LIN, Shuei L. ; CASTAÑO, Ana P. ; NOWLIN, Brian T. ; LUPHER, Mark L. ; DUFFIELD, Jeremy S.: Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. In: *J. Immunol.* 183 (2009), Nr. 10, 6733–43. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0901473>. – DOI 10.4049/jimmunol.0901473. – ISBN 1550–6606 (Electronic)\r0022–1767 (Linking)
- [177] GIBBONS, Michael A. ; MACKINNON, Alison C. ; RAMACHANDRAN, Prakash ; DHALIWAL, Kevin ; DUFFIN, Rodger ; PHYTHIAN-ADAMS, Alexander T. ; VAN ROOIJEN, Nico ; HASLETT, Christopher ; HOWIE, Sarah E. ; SIMPSON, A. J. ; HIRANI, Nikhil ; GAULDIE, Jack ; IREDALE, John P. ; SETHI, Tariq ; FORBES, Stuart J.: Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184 (2011), Nr. 5, S. 569–581. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201010-17190C>. – DOI 10.1164/rccm.201010-17190C. – ISBN 1535–4970 (Electronic)\r1073–449X (Linking)
- [178] CHRYSOSTALIS, Ariane ; HUBERT, Dominique ; COSTE, Joël ; KANAAN, Reem ; BURGEL, Pierre R. ; DESMAZES-DUFEU, Nadine ; SOUBRANE, Olivier ; DUSSER, Daniel ; SOGNI, Philippe: Liver disease in adult patients with cystic fibrosis: A frequent and independent prognostic factor associated with death or lung transplantation. In: *J. Hepatol.* 55 (2011), Nr. 6, 1377–1382. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.03.028>. – DOI 10.1016/j.jhep.2011.03.028. – ISSN 01688278

- [179] BLANCO, Paola G. ; ZAMAN, Munir M. ; JUNAIDI, Omer ; SHETH, Sunil ; YANTISS, Rhonda K. ; NASSER, Imad a. ; FREEDMAN, Steven D.: Induction of colitis in cftr-/- mice results in bile duct injury. In: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287 (2004), aug, Nr. 2, G491–6. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00452.2003>. – DOI 10.1152/ajpgi.00452.2003. – ISSN 0193–1857
- [180] MARTIN, Camilia R. ; ZAMAN, Munir M. ; KETWAROO, Gyanprakash a. ; BHUTTA, Abdul Q. ; CORONEL, Emmanuel ; POPOV, Yury ; SCHUPPAN, Detlef ; FREEDMAN, Steven D.: CFTR dysfunction predisposes to fibrotic liver disease in a murine model. In: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 303 (2012), Nr. 4, G474–81. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00055.2012>. – DOI 10.1152/ajpgi.00055.2012. – ISSN 1522–1547
- [181] DONG, Fangcong ; ZHANG, Lulu ; HAO, Fuhua ; TANG, Huiru ; WANG, Yulan: Systemic responses of mice to dextran sulfate sodium-induced acute ulcerative colitis using 1H NMR spectroscopy. In: *J. Proteome Res.* 12 (2013), Nr. 6, S. 2958–2966. <http://dx.doi.org/10.1021/pr4002383>. – DOI 10.1021/pr4002383. – ISSN 15353893
- [182] ARAKI, Yoshio ; SUGIHARA, Hiroyuki ; HATTORI, Takanori: In vitro effects of dextran sulfate sodium on a Caco-2 cell line and plausible mechanisms for dextran sulfate sodium-induced colitis. In: *Oncol. Rep.* 16 (2006), Nr. 6, S. 1357–1362. – ISBN 1021–335X (Print)
- [183] SEKI, Ekihiro ; DE MINICIS, Samuele ; OSTERREICHER, Christoph H. ; KLUWE, Johannes ; OSAWA, Yosuke ; BRENNER, David a. ; SCHWABE, Robert F.: TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. In: *Nat. Med.* 13 (2007), Nr. 11, S. 1324–1332. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1663>. – DOI 10.1038/nm1663. – ISBN 1078–8956 (Print)\n1078–8956 (Linking)
- [184] HAMMERICH, Linda ; TACKE, Frank: Role of gamma-delta T cells in liver inflammation and fibrosis. In: *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 5 (2014), Nr. 2, 107–13. <http://dx.doi.org/10.4291/wjgp.v5.i2.107>. – DOI 10.4291/wjgp.v5.i2.107. – ISBN 2150–5330 (Print)\r2150–5330 (Linking)
- [185] MAIR, Markus ; ZOLLNER, Gernot ; SCHNELLER, Doris ; MUSTEANU, Monica ; FICKERT, Peter ; GUMHOLD, Judith ; SCHUSTER, Christian ; FUCHSBICHLER, Andrea ; BILBAN, Martin ; TAUBER, Stefanie ; ESTERBAUER, Harald ; KENNER, Lukas ; POLI, Valeria ; BLAAS, Leander ; KORNFELD, Jan W. ; CASANOVA, Emilio ; MIKULITS, Wolfgang ; TRAUNER, Michael ; EFERL, Robert: Signal

- Transducer and Activator of Transcription 3 Protects From Liver Injury and Fibrosis in a Mouse Model of Sclerosing Cholangitis. In: *Gastroenterology* 138 (2010), Nr. 7, 2499–2508. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.02.049>. – DOI 10.1053/j.gastro.2010.02.049. – ISSN 00165085
- [186] LOUIS, H ; VAN LAETHEM, J L. ; WU, W ; QUERTINMONT, E ; DEGRAEF, C ; VAN DEN BERG, K ; DEMOLS, A ; GOLDMAN, M ; LE MOINE, O ; GEERTS, A ; DEVIÈRE, J: Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. In: *Hepatology* 28 (1998), dec, Nr. 6, 1607–15. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.510280621>. – DOI 10.1002/hep.510280621. – ISSN 0270–9139
- [187] HUNG, Kung S. ; LEE, Tsung H. ; CHOU, Wen Y. ; WU, Chia L. ; CHO, Chung L. ; LU, Cheng N. ; JAWAN, Bruno ; WANG, Cheng H.: Interleukin-10 gene therapy reverses thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336 (2005), Nr. 1, S. 324–331. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.085>. – DOI 10.1016/j.bbrc.2005.08.085. – ISSN 0006291X
- [188] TJANDRA, Kartika ; LE, Tai ; SWAIN, Mark G.: Experimental colitis attenuates development of toxin-induced cholangitis in rats. In: *Dig. Dis. Sci.* 47 (2002), Nr. 6, S. 1216–1223. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1015330809095>. – DOI 10.1023/A:1015330809095. – ISSN 01632116
- [189] SARAIVA, Margarida ; O’GARRA, Anne: The regulation of IL-10 production by immune cells. In: *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010), Nr. 3, 170–181. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2711>. – DOI 10.1038/nri2711. – ISBN 1474–1733
- [190] KÜHN, R ; LÖHLER, J ; RENNICK, Donna ; RAJEWSKY, Klaus ; MÜLLER, W: Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. In: *Cell* 75 (1993), oct, Nr. 2, 263–74. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80068-P](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(93)80068-P). – DOI 10.1016/0092-8674(93)80068-P. – ISBN 0092-8674 (Print)\r0092-8674 (Linking)
- [191] HÖCHST, Bastian ; MIKULEC, Julita ; BACCEGA, Tania ; METZGER, Christina ; WELZ, Meike ; PEUSQUENS, Julia ; TACKE, Frank ; KNOLLE, Percy ; KURTS, Christian ; DIEHL, Linda ; LUDWIG-PORTUGALL, Isis: Differential induction of Ly6G and Ly6C positive myeloid derived suppressor cells in chronic kidney and liver inflammation and fibrosis. In: *PLoS One* 10 (2015), Nr. 3, S. 1–13. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0119662>. – DOI 10.1371/journal.pone.0119662. – ISSN 19326203
- [192] SUH, Yang G. ; KIM, Ja K. ; BYUN, Jin S. ; YI, Hyon S. ; LEE, Young S. ; EUN, Hyuk S. ; KIM, So Y. ; HAN, Kwang H. ; LEE, Kwan S. ; DUESTER, Gregg ;

- FRIEDMAN, Scott L. ; JEONG, Won I.: CD11b+ Gr1+ bone marrow cells ameliorate liver fibrosis by producing interleukin-10 in mice. In: *Hepatology* 56 (2012), Nr. 5, S. 1902–1912. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.25817>. – DOI 10.1002/hep.25817. – ISBN 1527–3350 (Electronic)\n0270–9139 (Linking)
- [193] YOUN, Je-In ; NAGARAJ, Srinivas ; COLLAZO, Michelle ; GABRILOVICH, Dmitry I.: Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. In: *J. Immunol.* 181 (2008), Nr. 8, 5791–802. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.181.8.5791>. – DOI 10.4049/jimmunol.181.8.5791. – ISBN 0022–1767
- [194] YOUN, Je-In ; GABRILOVICH, Dmitry I.: The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. In: *Eur. J. Immunol.* 40 (2010), Nr. 11, 2969–75. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201040895>. – DOI 10.1002/eji.201040895. – ISBN 0014–2980 (Print)\r1521–4141 (Electronic)
- [195] MOVAHEDI, Kiavash ; GUILLIAMS, Martin ; VAN DEN BOSSCHE, Jan ; VAN DEN BERGH, Rafael ; GYSEMANS, Conny ; BESCHIN, Alain ; DE BAETSELIER, Patrick ; VAN GINDERACHTER, Jo A.: Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell suppressive activity. In: *Blood* 111 (2008), Nr. 8, S. 4233–4244. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-07-099226>. – DOI 10.1182/blood-2007-07-099226. – ISBN 0006–4971 (Print)\n0006–4971 (Linking)
- [196] HAMMERICH, Linda ; TACKE, Frank: Emerging roles of myeloid derived suppressor cells in hepatic inflammation and fibrosis. In: *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 6 (2015), Nr. 3, 43–50. <http://dx.doi.org/10.4291/wjgp.v6.i3.43>. – DOI 10.4291/wjgp.v6.i3.43
- [197] RESHETNYAK, Vasiliy I.: Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation. In: *World J. Gastroenterol.* 19 (2013), Nr. 42, 7341–60. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v19.i42.7341>. – DOI 10.3748/wjg.v19.i42.7341. – ISSN 2219–2840
- [198] JAHNEL, J. ; FICKERT, P. ; HAUER, A. C. ; HOGENAUER, C. ; AVIAN, A. ; TRAUNER, M.: Inflammatory Bowel Disease Alters Intestinal Bile Acid Transporter Expression. In: *Drug Metab. Dispos.* 42 (2014), jul, Nr. 9, 1423–1431. <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.114.058065>. – DOI 10.1124/dmd.114.058065. – ISBN 0090–9556
- [199] MIETHKE, Alexander G. ; ZHANG, Wujuan ; SIMMONS, Julia ; TAYLOR, Amy E. ; SHI, Tiffany ; SHANMUKHAPPA, Shiva K. ; KARNS, Rebekah ; WHITE, Shana ;

- JEGGA, Anil G. ; LAGES, Celine S. ; NKININ, Stephenson ; KELLER, Bradley T. ; SETCHELL, Kenneth D.: Pharmacological inhibition of apical sodium-dependent bile acid transporter changes bile composition and blocks progression of sclerosing cholangitis in multidrug resistance 2 knockout mice. In: *Hepatology* (2015), n/a–n/a. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.27973>. – DOI 10.1002/hep.27973. – ISSN 02709139
- [200] ZHOU, Xueyan ; CAO, Lijuan ; JIANG, Changtao ; XIE, Yang ; CHENG, Xuefang ; KRAUSZ, Kristopher W. ; QI, Yunpeng ; SUN, Lu ; SHAH, Yatrik M. ; GONZALEZ, Frank J. ; WANG, Guangji ; HAO, Haiping: PPAR α -UGT axis activation represses intestinal FXR-FGF15 feedback signalling and exacerbates experimental colitis. In: *Nat. Commun.* 5 (2014), 4573. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5573>. – DOI 10.1038/ncomms5573. – ISBN 2041–1723 (Electronic) 2041–1723 (Linking)
- [201] LUPP, Claudia ; ROBERTSON, Marilyn L. ; WICKHAM, Mark E. ; SEKIROV, Inna ; CHAMPION, Olivia L. ; GAYNOR, Erin C. ; FINLAY, B. B.: Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. In: *Cell Host Microbe* 2 (2007), Nr. 2, S. 119–129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2007.06.010>. – DOI 10.1016/j.chom.2007.06.010. – ISBN 1934–6069 (Electronic)\r1931–3128 (Linking)
- [202] RIDLON, Jason M. ; KANG, Dae-Joong ; HYLEMON, Phillip B.: Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. In: *J. Lipid Res.* 47 (2006), Nr. 2, 241–59. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.R500013-JLR200>. – DOI 10.1194/jlr.R500013-JLR200. – ISBN 0022–2275 (Print)\r0022–2275 (Linking)
- [203] ARAKI, Y ; ANDOH, A ; TSUJIKAWA, T ; FUJIYAMA, Y ; BAMBIA, T: Alterations in intestinal microflora, faecal bile acids and short chain fatty acids in dextran sulphate sodium-induced experimental acute colitis in rats. In: *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13 (2001), Nr. 2, 107–112. <http://dx.doi.org/10.1097/00042737-200102000-00004>. – DOI 10.1097/00042737-200102000-00004. – ISBN 0954–691X (Print)
- [204] DIKOPOULOS, N. ; SCHMID, R. M. ; BACHEM, M. ; BUTTENSCHOEN, K. ; ADLER, G. ; CHIANG, J. Y L. ; WEIDENBACH, H.: Bile synthesis in rat models of inflammatory bowel diseases. In: *Eur. J. Clin. Invest.* 37 (2007), Nr. 3, S. 222–230. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2362.2007.01779.x>. – DOI 10.1111/j.1365–2362.2007.01779.x. – ISBN 4973150040331
- [205] KARLSSON, Agneta ; JÄGERVALL, Ake ; PETTERSSON, Madeleine ; ANDERSSON, Ann-Katrin ; GILLBERG, Per-Göran ; MELGAR, Silvia: Dextran sulphate sodium

- induces acute colitis and alters hepatic function in hamsters. In: *Int. Immunopharmacol.* 8 (2008), jan, Nr. 1, 20–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2007.10.007>. – DOI 10.1016/j.intimp.2007.10.007. – ISSN 1567–5769
- [206] MOUSTAFA, Tarek ; FICKERT, Peter ; MAGNES, Christoph ; GUELLY, Christian ; THUERINGER, Andrea ; FRANK, Sasa ; KRATKY, Dagmar ; SATTLER, Wolfgang ; REICHER, Helga ; SINNER, Frank ; GUMHOLD, Judith ; SILBERT, Dagmar ; FAULER, Günter ; HÖFLER, Gerald ; LASS, Achim ; ZECHNER, Rudolf ; TRAUNER, Michael: Alterations in lipid metabolism mediate inflammation, fibrosis, and proliferation in a mouse model of chronic cholestatic liver injury. In: *Gastroenterology* 142 (2012), Nr. 1, 140–151.e12. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2011.09.051>. – DOI 10.1053/j.gastro.2011.09.051. – ISBN 0016–5085

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mir mit Rat und Tat beim Anfertigen meiner Doktorarbeit zur Seite standen.

Zuallererst gilt mein herzlicher Dank Prof. Dr. Samuel Huber, in dessen Arbeitsgruppe ich diese Arbeit anfertigen durfte und der stets ein offenes Ohr und hilfreiche Hinweise für meine zahlreichen Fragen hatte.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Gisa Tiegs für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg Entzündung und Regeneration und bei Prof. Dr. Maura Dandri-Petersen, Prof. Dr. Christoph Schramm sowie Prof. Dr. Johannes Herkel für die Mitwirkung an meiner Betreuungskommission im Rahmen des Graduiertenkollegs bedanken.

Cathleen Haueis insbesondere und allen weiteren Mitgliedern der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die Einarbeitung in die Laborarbeit, die freundschaftliche Atmosphäre in der Gruppe und ihre kollegiale Unterstützung.

Danken möchte ich auch den Kooperationspartnern aus anderen Instituten des UKE: Dr. Mareike von Petersdorf für ihre histopathologische Expertise, PD Dr. Thomas Meyer für die mikrobiologische Diagnostik sowie dem Institut für Laboratoriumsmedizin für die Durchführung der laborchemischen Analysen.

Ein herzliches Dankeschön für Korrekturlesen, hilfreiche Vorschläge und Motivation beim Verfassen dieser Arbeit an Dörte Kleinschmidt, Clara Lühr und Larissa Wilke.

Meinem Mann Christof ist es zu verdanken, dass diese Arbeit nicht an Problemen mit Textverarbeitungsprogrammen oder der Datensicherung scheiterte, ohne ihn wäre das Schreiben mit LaTeX nicht möglich gewesen.

8. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

9. Eidesstattliche Versicherung

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: