

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Innere Medizin, I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Prof. Dr. med. A.W. Lohse

Analyse der Wechselwirkung zwischen Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen und Lebererkrankungen im Mausmodell

Dissertation

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

vorgelegt von:

Niklas Steffens
aus Heinsberg

Harrisee 2018

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 11.06.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Samuel Huber

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. Stephan Storch

3. Gutachter: Prof. Dr. Dominik Bettenworth

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen	6
1.1.1	Klinik	6
1.1.2	Epidemiologie und vermutete Pathogenese	7
1.1.3	Extraintestinale Manifestationen Chronisch Entzündlicher Darmerkrankungen	8
1.2	Die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC)	9
1.2.1	Epidemiologie und Klinik der PSC	9
1.2.2	Pathogenese der PSC	10
1.3	Die Rolle der intestinalen Homöostase und der Einfluss ihrer Störung auf die Entwicklung einer Chronisch Entzündlichen Darmerkrankung	11
1.4	Die Rolle der Gallensäuren bei der Entstehung der CED	13
1.4.1	Biosynthese der Gallensäuren und ihre Schlüsselenzyme	13
1.4.2	Der enterohepatische Kreislauf	14
1.4.3	Die Rolle der Gallensäuren bei der Entstehung einer Entzündung im Verdauungstrakt	15
1.5	Experimentelle Mausmodelle einer PSC	17
1.5.1	Die Mdr2 ^{-/-} (Abcb4 ^{-/-}) Maus	17
1.5.2	Das DDC-Modell als chemisch induziertes Modell für die PSC	17
1.6	Experimentelle Kolitis-Modelle und ihre Verbindung mit dem PSC- Modell	18
1.6.1	Die DSS-Kolitis als chemisch induzierte Dickdarmentzündung	18
1.6.2	Adaptiver Transfer von Effektor-T-Helferzellen zur Induktion einer Dickdarmentzündung	18
1.6.3	Citrobacter Kolitis	19
1.7	Die Kaede Maus zur Studie von Zellmigration	20
1.8	Zielsetzung der Arbeit	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Material- und Geräteliste	22
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	22
2.1.2	Zusammensetzung verwendeter Puffer	26
2.1.3	Gerätschaften	27
2.2	Verwendete Mauslinien	28
2.2.1	Rechtliche Voraussetzungen	28
2.2.2	Versuchstiere	28
2.2.3	Zucht- und Haltungsbedingungen	29
2.2.4	Genotypisierung	29
2.3	Mausmodelle einer PSC und einer Kolitis	31
2.3.1	Akute und chronische DSS-Kolitis	31
2.3.2	Adaptiver Transfer von T-Zellen zur Induktion einer Dickdarmentzündung	31
2.3.3	Citrobacter Kolitis	31
2.3.4	Diethyl-1,4-Dihydro-2,4,6-trimethyl-3,5-pyridinedicarboxylat (DDC) als Chemisch induziertes Modell für eine PSC	32

2.4	Knochenmarkschimären	33
2.5	Kleintier-Endoskopie und UV-Photokonversion im Kolon	35
2.5.1	Kleintierendoskopie	35
2.5.2	UV-Photokonversion im Kolon mittels Endoskop	35
2.6	Analyse von Gallensäuren aus Gewebe und Stuhl	36
2.7	Zellisolation	37
2.7.1	Leukozytenisolation aus Kolongewebe	37
2.7.2	Leukozytenisolation aus Lebergewebe	38
2.7.3	Leukozytenisolation aus Milz- und Lymphknotengewebe	38
2.8	Durchflusszytometrie	40
2.8.1	Lebendfärbung isolierter Zellen	40
2.8.2	Oberflächenfärbung	40
2.8.3	Restimulation und intrazelluläre Färbung	40
2.9	In vitro Zelldifferenzierung	42
2.9.1	Isolation naiver CD4 ⁺ -Zellen mittels MACS	42
2.9.2	Th1/Th17/Th0 Polarisierende Zellkulturbedingungen	43
2.10	Genexpressionsanalysen aus Gewebe	45
2.10.1	RNA-Aufreinigung aus Gewebe	45
2.10.2	mRNA-Isolation bei DSS-kontaminierten Proben	45
2.10.3	cDNA-Synthese und Real-Time-PCR	46
2.11	Histopathologie von Gewebeproben	47
2.12	Blutentnahmen und Blutanalysen	48
2.13	Statistische Auswertung	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Einfluss einer Kolitis auf die Entstehung einer Leberpathologie	50
3.1.1	Akute und chronische DSS-Kolitis bei Wildtyp Mäusen	50
3.1.2	Transferkolitis in Rag1 ^{-/-} Mäusen	57
3.2	Einfluss einer DSS-Kolitis auf die Leberpathologie bei Tieren mit einem PSC-ähnlichen Phänotyp	62
3.2.1	Akute DSS-Kolitis in Mdr2 ^{-/-} Mäusen	62
3.2.2	Chronische DSS-Kolitis in Mdr2 ^{-/-} Mäusen	65
3.2.3	Auswirkung einer akuten DSS-Kolitis bei Wildtyp Mäusen mit einer chemisch induzierten Leberpathologie	68
3.3	Kommen die Zellen, die im Rahmen einer Kolitis in der Leber akkumulieren direkt aus dem Kolon und welche Zellgruppen migrieren überwiegend aus dem Kolon in die Leber?	73
3.3.1	Spezifische, endoskopische Photokonversion von Kaede Zellen im Kolon	73
3.3.2	Akute DSS-Kolitis in Kaede Mäusen	74
3.3.3	T-Zell-abhängige Kolitis	76
3.3.4	Akute DSS-Kolitis in Mdr2 ^{-/-} Mäusen nach der Transplantation von Kaede Knochenmark	77
3.3.5	Chronische DSS-Kolitis in Mdr2 ^{-/-} Mäusen nach der Transplantation von Kaede Knochenmark	78

3.4	Der Einfluss T-zellabhängiger Kolitismodelle auf eine PSC-ähnliche Leberpathologie	80
3.4.1	Transferkolitis in Rag1 ^{-/-} Mdr2 ^{-/-} Mäusen	80
3.4.2	Citrobacter rodentium Infektion als infektiöses Kolitis-Modell	83
3.5	Einfluss des angeborenen Immunsystems auf die Leberpathologie während einer Kolitis	87
3.5.1	Depletion von CD4 ⁺ Zellen mittels monoklonalem Anti-CD4-Antikörper in Mdr2 ^{-/-} Mäusen während einer chronischen DSS-Kolitis	87
3.5.2	Chronische DSS-Kolitis bei Rag1 ^{-/-} Mdr2 ^{-/-} Mäusen	91
3.6	Die Rolle der MMP8 in dem beobachteten Phänotyp	94
3.7	Einfluss einer DSS-Kolitis auf die Gallensäurezusammensetzung bei Wildtyp und Mdr2 ^{-/-} Mäusen	99
4	Diskussion	103
4.1	Eine Dickdarmentzündung führt zu einer Akkumulation von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in der Leber	103
4.2	Bei den Zellen, die aus dem Kolon während einer DSS-Kolitis in die Leber migrieren, handelt es sich um Zellen des adaptiven Immunsystems	109
4.3	T-Zellabhängige Kolitis-Modelle haben keinen Einfluss auf die Leberpathologie in Mdr2 ^{-/-} Mäusen	112
4.4	Die Zellen des adaptiven Immunsystems sind nicht verantwortlich für den beobachteten Phänotyp in Mdr2 ^{-/-} Mäusen	114
4.5	MMP8 ist nicht verantwortlich für die beobachtete Reduktion der Leberfibrose im Rahmen einer DSS-Kolitis bei Mdr2 ^{-/-} Mäusen	116
4.6	Die Gallensäurezusammensetzung bei Wildtyp-Mäuse und Mdr2 ^{-/-} Mäuse wird durch eine akute DSS-Kolitis in unterschiedlicher Weise beeinflusst	118
4.7	Ausblick	123
5	Zusammenfassung	125
6	Abstract	127
7	Abkürzungsverzeichnis	129
8	Literaturverzeichnis	130
9	Danksagung	138
10	Lebenslauf	139
11	Eidesstattliche Erklärung	141

1 Einleitung

1.1 Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen

Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind Erkrankungen, die sich insbesondere durch eine Entzündung des Verdauungstraktes auszeichnen und ein Wechselspiel aus Remission und wiederkehrender Krankheitsaktivität aufweisen. Klinisch werden zwei Hauptentitäten unterschieden, der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa. Zu unterscheiden sind diese vor allem durch ihr Ausbreitungsmuster und die Lokalisation der Entzündung im intestinalen Schleimhautgewebe. Die Klinik, Epidemiologie, Pathogenese und extraintestinalen Manifestationen der CED werden im weiteren Verlauf erläutert. Insbesondere die Verbindung zwischen CED und der Primär Sklerosierenden Cholangitis stehen dabei im Fokus.

1.1.1 Klinik

Die klinische Präsentation der Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen bietet eine Möglichkeit, diese voneinander abzugrenzen. Bei der Colitis ulcerosa ist die Entzündung vor allem auf den Dickdarm begrenzt. Meistens beginnt sie im Rektum/Sigmoid und ist kontinuierlich aufsteigend. In einigen Fällen kann das gesamte Kolon („Pankolitis“) betroffen sein und die Entzündung bis in das terminale Ileum reichen („backwash ileitis“). Beim Morbus Crohn können alle Abschnitte des Gastrointestinaltrakts betroffen sein. Dabei zeigt er meist ein diskontinuierliches Befallsmuster, was bedeutet, dass neben entzündeten Bereichen auch vollständig intakte Darmabschnitte liegen. Ein wesentlicher histologischer Unterschied zwischen beiden Krankheitsbildern ist, dass beim Morbus Crohn eine transmurale, also eine alle Gewebeschichten betreffende, Entzündung vorliegt, während bei der Colitis ulcerosa ausschließlich die Mukosa betroffen ist. [1, 2]

Klinisch fallen Patienten, die an einer Colitis ulcerosa erkrankt sind vor allem durch blutig-schleimige Diarrhöen auf, die bei der Defäkation von Tenesmen begleitet sein können. Diese Form der Diarrhö kommt seltener beim Morbus Crohn vor und falls, dann vor allem bei einem Befall des Kolons. Mögliche weitere Symptome beim Morbus Crohn sind Fieber, Schwindel und Erbrechen sowie abdominelle Schmerzen und Zeichen der Obstruktion des Gastrointestinaltraktes. Trotz dieser klinischen, endoskopischen und histologischen Unterschiede ist es manchmal schwierig, eine exakte Diagnose zu stellen. In diesen Fällen wird der Symptomkomplex als unklassifizierte CED bezeichnet.

Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit ist die mit der Primär Sklerosierenden Cholangitis (PSC) assoziierte Kolitis, bei der diskutiert wird, ob diese eine eigene Entität der CED darstellt. In den meisten Fällen wird diese Form der Darmentzündung als Colitis ulcerosa klassifiziert. Bei Betrachtung des Ausbreitungsmusters zeigen sich einige Besonderheiten. Während mehrere Studien berichten, dass die überwiegende Zahl der PSC-Patienten mit einer Kolitis insbesondere eine Pankolitis zeigen [3-5], konnte bisher nur in wenigen Studien dargelegt werden, dass diese besondere Form der Dickdarmentzündung das Rektum ausspart bzw. häufiger mit einer sogenannten ‚backwash ileitis‘ vergesellschaftet ist [4]. Mehrere Studien haben dagegen gezeigt, dass die Koexistenz von Primär Sklerosierender Cholangitis und CED die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines kolorektalen Karzinoms deutlich erhöht [3-6]. Interessanterweise scheint die Krankheitsaktivität der Darmentzündung einen protektiven Effekt auf den Verlauf einer PSC zu haben [7], jedoch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Dysplasien bzw. einem Karzinom im Kolon zu erhöhen [6]. Andere Studien haben gezeigt, dass eine Kolektomie vor oder während einer Lebertransplantation die Patienten vor dem Wiederauftreten einer PSC schützt [8]. Wiederum andere Untersuchungsergebnisse legen den Schluss nahe, dass eine Kolektomie bei Colitis ulcerosa Patienten vor der Diagnosestellung einer PSC sowohl das Risiko einer notwendigen Lebertransplantation als auch das Risiko zu sterben verringert [9]. Zusammen genommen weisen diese Erkenntnisse darauf hin, dass PSC und CED bei der Entstehung in einem engen Zusammenhang stehen, der klinische Verlauf der PSC jedoch nicht zwingend negativ von der Kolitisaktivität beeinflusst wird.

1.1.2 Epidemiologie und vermutete Pathogenese

Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen sind Erkrankungen, die seit Beginn des 19. Jahrhunderts (Colitis ulcerosa) bzw. seit dem 20. Jahrhundert (Morbus Crohn) bekannt sind und deren Inzidenz und Prävalenz während des letzten Jahrhunderts stetig zugenommen haben [2]. Für die Colitis ulcerosa wird je nach geographischer Lage aktuell eine Inzidenz von 1,2 bis 20,3 Fälle auf 100.000 Personen pro Jahr und eine Prävalenz von 7,6 bis 246 Fälle pro 100.000 Personen pro Jahr angegeben. Für den Morbus Crohn liegt die Inzidenz bei 0,03 bis 15,6 Fälle pro 100.000 Personen pro Jahr und die Prävalenz bei 3,6 bis 214 Fällen pro 100.000 Personen pro Jahr [10].

Umfangreiche Studien der letzten Jahrzehnte lassen vermuten, dass Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen eine multifaktorielle Genese haben. Hierbei spielen genetische Faktoren, das Mikrobiom, das Immunsystem und das sogenannte Exposom (alle äußeren Einflüsse) eine

Rolle. Insbesondere sind Menschen, die in Industrieländern wie Nordamerika und Nordeuropa leben, von diesen Erkrankungen betroffen. Migrieren Menschen aus Entwicklungsländern in Industrieländer mit einer erhöhten Inzidenz für Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen, gleichen sich bei ihnen die Risiken zur Entwicklung einer CED denen der in Industrieländern aufgewachsenen Menschen an [11]. Studien haben gezeigt, dass eine westliche Lebensweise mit dem Auftreten Chronisch Entzündlicher Darmerkrankungen verbunden ist. So konnte nachgewiesen werden, dass eine zucker- und fetthaltige Ernährungsweise sowie Stress, die häufige Einnahme von Medikamenten und ein hoher sozioökonomischer Status die Entwicklung einer Chronisch Entzündlichen Darmerkrankung begünstigen [12]. Studien, die den Einfluss des Zigarettenkonsums oder der Appendektomie auf den Verlauf einer CED untersucht haben, zeigen, dass sich beides zwar eher protektiv auf die Colitis ulcerosa auswirkt, den Morbus Crohn hingegen verschlimmert [11]. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bis zum jetzigen Zeitpunkt die Ursachen für die Entwicklung einer Chronisch Entzündlichen Darmerkrankung nicht geklärt sind.

1.1.3 Extraintestinale Manifestationen Chronisch Entzündlicher Darmerkrankungen

Neben den bereits unter 1.1.1 beschriebenen Symptomen kommt es bei einem nicht unerheblichen Anteil der CED-Patienten zur Ausbildung extraintestinaler Manifestationen der Erkrankungen. Insbesondere Patienten mit einem Morbus Crohn sind davon betroffen. Diese Manifestationen können fast alle Organsysteme betreffen. Die Literaturangaben zur Prävalenz der extraintestinalen Manifestation schwanken stark in Abhängigkeit vom Design der jeweiligen Studien. Eine bevölkerungsbasierte Studie von Bernstein *et al.* [13] hat gezeigt, dass 6,2 % der CED-Patienten an einer der sechs Hupterscheinungen der extraintestinalen Manifestation erkranken. Zu diesen sechs Erscheinungsformen gehören die Iritis, die Uveitis, die Ankylosierende Spondylitis, das Pyoderma gangraenosum, das Erythema nodosum und die Primär Sklerosierende Cholangitis. Dabei sind Augenentzündungen wie die Iritis oder die Uveitis die häufigsten Erscheinungsformen sowohl beim Morbus Crohn als auch bei der Colitis ulcerosa. Die PSC hingegen tritt häufiger bei der Colitis ulcerosa und dort insbesondere bei Männern auf. [13]

1.2 Die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC)

Bei der Primär Sklerosierenden Cholangitis handelt es sich um eine Obliteration der extra- und intrahepatischen Gallengänge unklarer Genese, die im Endstadium zu Leberzirrhose und Leberversagen führen kann, was nicht selten mit der Notwendigkeit einer Lebertransplantation einhergeht.

1.2.1 Epidemiologie und Klinik der PSC

Die Inzidenzrate für die PSC liegt zurzeit bei 0-0,92 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr, während die Prävalenz zurzeit bei 0-16,2 Erkrankten pro 100.000 Einwohner liegt. Das Geschlechterverhältnis Männer zu Frauen liegt bei 2:1. 70% der PSC-Patienten leiden zusätzlich an einer klinisch manifesten CED. [14]

Klinisch verläuft die Erkrankung zunächst häufig inapparent. Im Verlauf präsentieren sich die Patienten mit eher unspezifischen Symptomen wie Juckreiz und Schläfrigkeit. Lediglich die dauerhafte Veränderung leberspezifischer Laborparameter gibt meistens Anlass zur weiteren Diagnostik. Bildgebende und interventionelle Verfahren wie die Magnetresonanztomographie (MRCP) und die Endoskopische Retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) zeigen im typischen Verlauf eine perlenschnurartige Obliteration der extra- und intrahepatischen Gallengänge. Histologisch ist für die PSC die konzentrische, zwiebelschalenartige, periduktale Fibrosierung pathognomonisch. Im weiteren Verlauf kommt es zur Atrophie und schließlich zum Verlust der mittelgroßen und großen Gallengänge mit einer begleitenden Leberfibrose, die letztendlich zu einer Leberzirrhose und im schlimmsten Fall zu einem Leberversagen führen kann. Sind die laborchemischen und histologischen Hinweise für das Vorliegen einer PSC vorhanden, lassen sich jedoch durch die Bildgebung nicht bestätigen, dann spricht man von einer "small-duct"-PSC. [15, 16]

In einer Studie von Burak *et al.* [17] konnte bei nur 14% der Patienten nach einer perkutanen Leberbiopsie eine Atrophie bzw. der Verlust der Gallengänge gefunden werden. Diese Studie zeigte, dass die Diagnose einer PSC nur in Zusammenschau mit Bildgebung, klinisch-chemischen Laborparametern, der klinischen Präsentation der Patienten und nach Ausschluss von Ursachen, die für die Sekundär Sklerosierende Cholangitis verantwortlich sind, zu stellen ist [18].

Als Komplikation der PSC ist vor allem die Leberzirrhose mit der Notwendigkeit einer Lebertransplantation zu nennen. Des Weiteren sind PSC-Patienten einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines cholangiozellulären Karzinoms ausgesetzt [19]. PSC-Patienten, die

zusätzlich an einer Colitis ulcerosa erkrankt sind, haben verglichen mit Patienten, die ausschließlich an einer Colitis ulcerosa leiden, ein erhöhtes Risiko an einem kolorektalem Karzinom zu erkranken [19, 20].

1.2.2 Pathogenese der PSC

Die Pathogenese der PSC ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht verstanden. Aktuell existieren mehrere Hypothesen, die versuchen, die Ätiologie und Pathogenese zu erklären. Die Tatsache, dass die PSC schlecht auf eine immunsuppressive Therapie anspricht, lässt vermuten, dass dieser Erkrankung nicht ausschließlich eine entzündliche Genese zu Grunde liegt, sondern dass sie multifaktoriell bedingt ist [18].

Eine etablierte These ist, dass eine Fehlexpression von intestinalen Zelladhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Leberendothelzellen eine Rolle spielt. An diese können T-Zellen, die zuvor im Verdauungstrakt zu intestinalen T-Helfer-Zellen induziert wurden, gebunden werden. Diese Fehlrekrutierung intestinaler T-Zellen in die Leber soll schließlich eine Entzündung in der Leber begünstigen. [21]

Neuere Untersuchungen rücken einen anderen Mechanismus in den Vordergrund. So zeigen nach einer Studie von Tabibian *et al.* Cholangiozyten von PSC-Patienten gehäuft Seneszenz und einen seneszenz-aktivierten-sekretorischen Phänotyp. Dieser führt zur Freisetzung proinflammatorischer und profibrotischer Cytokine aus den Cholangiozyten. *In vitro* konnten Cholangiozyten durch exogene (LPS) und endogene Substanzen in einen solchen Zustand versetzt werden. [22]

Des Weiteren haben neuere Studien Hinweise darauf gegeben, dass das intestinale Mikrobiom eine nicht unerhebliche Rolle bei der Pathogenese der PSC spielt. Durch die Beobachtung, dass die PSC häufig in Kombination mit der Colitis ulcerosa auftritt, wurde die ‚leaky gut‘-Hypothese formuliert. Demnach kommt es auf Grund der intestinalen Entzündung zu einer erhöhten Permeabilität des Darmgewebes und der Bakterien bzw. ihrer Bestandteile, oder Metabolite können über das Pfortadersystem die Leber erreichen. Auf unterschiedliche Weise sollen sie dann zu einer Entzündungsreaktion mit einer darauffolgenden Fibrosierung des Lebergewebes führen. [23]

Andere Studien haben vor allem einen Zusammenhang zwischen den Allelvarianten der Humanem Leukozyten Antigen (HLA-A1,-B3,-DR3) und der PSC festgestellt. So scheinen Patienten mit eben diesen Allelvarianten besonders häufig an einer PSC zu erkranken. [24].

1.3 Die Rolle der intestinalen Homöostase und der Einfluss ihrer Störung auf die Entwicklung einer Chronisch Entzündlichen Darmerkrankung

Wie bereits erwähnt, gibt es unterschiedliche Faktoren, die die Entwicklung einer CED begünstigen können. Dabei scheinen vier verschiedene Kategorien einen großen Einfluss zu haben: genetische Faktoren [25], das Immunsystem [11], das Mikrobiom sowie das Exposom (die Gesamtheit der auf den Körper einwirkenden Umweltfaktoren) [25, 26].

Der Darm bildet mit seiner epithelialen Oberfläche einen großen Teil der Abgrenzung des Körpers gegen seine Umwelt. Er hat vielfältige Funktionen, etwa die Verdauung und Aufnahme von Nahrungsbestandteilen, die Beteiligung an Stoffwechselprozessen, das Training des Immunsystems, die Abwehr von potenziell schädlichen Mikroorganismen, und vieles mehr. Dabei stehen die intestinalen Epithelzellen auf der Seite des Darmlumens in einem ständigen Kontakt mit der Umwelt in Form des intestinalen Mikrobioms, von Nahrungsbestandteilen oder Gallensäuren. Auf der basalen Seite besteht ein enger Kontakt zu Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, dem Gefäßsystem und dem enterischen Nervensystem. Um die Homöostase im Darm aufrechtzuerhalten und das Eindringen körperfremder Stoffe zu verhindern, gibt es unterschiedliche Mechanismen. Die intestinalen Epithelien bilden eine Schleimschicht, auch Mucus genannt, die reich an antimikrobiellen Proteinen ist und das Überwinden der Schleimhautbarriere durch Mikroorganismen erschweren soll. Einige Studien konnten demonstrieren, dass eine Reduktion der Schleimbarriere durch den erhöhten Konsum von Emulgatoren, die reichlich in industriell gefertigter Nahrung enthalten sind, die Entzündungsanfälligkeit im Darm erhöht [27]. Aber auch eine gestörte Zusammensetzung der antimikrobiellen Bestandteile im Schleim führt zu einer Akkumulation von pro-inflammatorischen Zellen in der Darmmukosa [28].

Die nächste Barriere bilden die Epithelzellen selbst. Diese sind unter anderem in der Lage, über extra- und intrazelluläre Rezeptoren die Anwesenheit von pathogenen Mikroorganismen zu registrieren und auf diese zu reagieren. So können sie beispielsweise über parakrine Mechanismen Zellen des Immunsystems rekrutieren. Genetische Fehlfunktionen in Rezeptorsystemen wie NOD2 gelten als potenzielle Risikofaktoren für die Entwicklung Chronisch Entzündlicher Darmerkrankungen [29]. Darüber hinaus gibt es immer wieder Hinweise auf eine Immunzell-vermittelte Steigerung der intestinalen Permeabilität. So konnte etwa in einer Studie nachgewiesen werden, dass eine intestinale T-Zellaktivierung zu einer erhöhten Darmpermeabilität führt [30]. Andere Untersuchungen zeigen, dass pro-

inflammatorische Zytokine wie TNF α zu einer Dysfunktion auf Ebene der Tight-junctions führen können und somit die intestinale Permeabilität erhöhen [31]. Außerdem gibt es immer wieder Berichte, dass auch das enterische Nervensystems an der Erhöhung der intestinalen Durchlässigkeit beteiligt sein könnte [30, 32].

Somit zeigt sich, dass viele verschiedene Faktoren einen Einfluss auf das intestinale Gleichgewicht haben und die Entwicklung einer CED begünstigen können.

1.4 Die Rolle der Gallensäuren bei der Entstehung der CED

Die Galle besteht zu 82 % aus Wasser, daneben aus Hydrogencarbonaten, Gallensäuren, Gallenfarbstoffen (etwa Bilirubin), Phospholipiden (wie Lecithin), Cholesterin und Endmetaboliten von Medikamenten und Steroidhormonen. Die Gallensäuren spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der Verdauung sowie der Aufnahme von Fetten und fettlöslichen Substanzen. Darüber hinaus beeinflussen sie verschiedene Stoffwechselwege, die Zusammensetzung des Mikrobioms und die Eliminierung von Xenobiotika. Gallensäuren sind zusätzlich in der Lage, Zellen des Immunsystems zu aktivieren. Der Stoffwechsel der Gallensäuren unterliegt einer komplexen (Auto-)Regulation im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufs. [33, 34]

1.4.1 Biosynthese der Gallensäuren und ihre Schlüsselenzyme

Die Grundlage für die *de novo*-Synthese der Gallensäuren in der Leber bildet das Cholesterin. Nur in der Leber sind alle 14 notwendigen Enzyme vorhanden, die für die Bildung der primären Gallensäuren notwendig sind. Dabei gibt es artspezifische Unterschiede in der Zusammensetzung der primären Gallensäuren. Während sich beim Menschen diese vor allem aus den hydrophoben Gallensäuren Chenodeoxycholsäure, Cholsäure und Deoxycholsäure zusammensetzen, sind dies bei der Maus ein eher hydrophiles Gemisch aus Muricholsäure und Cholsäure. [33]

Das Schlüsselenzym der Gallensäurebiosynthese *Cyp7A1* (Cholesterol-7 α -Hydroxylase) gehört zu der Cytochrom-P450-Enzymfamilie und katalysiert die α -7-Hydroxylierung des Cholesterins. Dieses Enzym ist der erste und zugleich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gallensäuresynthese. Nachdem die primären Gallensäuren durch ein komplexes Zusammenspiel aus verschiedenen Cytochrom-P450-Enzymen gebildet wurden, wird ein Teil der selbigen mit Taurin oder Glycin konjugiert. Für diesen enzymatischen Prozess werden insbesondere zwei Enzymkomplexe benötigt, die Gallensäure-Aminosäuretransferase (BAT) und die Gallensäure-CoA-Synthase (BACS). Die Konjugation erhöht die Löslichkeit der Gallensäuren und verringert so ihren toxischen Effekt auf die Zellen des Gallengangepithels (Cholangiozyten) bzw. die Hepatozyten selbst. Die Gallensäuren werden schließlich, ebenso wie alle anderen Bestandteile der Galle, von den Hepatozyten in die Gallengänge sezerniert. Dabei handelt es sich insbesondere bei den geladenen Molekülen um aktive Transportprozesse, für die spezielle Transportproteine benötigt werden. [35]

Im Gallengangssystem unterliegen die Gallensäuren dem cholangiohepatischen Kreislauf. Dies bedeutet, dass die Gallensäuren teilweise von den Gallengangsepithelien aufgenommen und an das Blut abgegeben werden, aus dem Blut werden sie erneut von den Hepatozyten aufgenommen, prozessiert und in die Gallengänge sekretiert. [36]

Gespeichert wird die Galle in der Gallenblase. Nach der Nahrungsaufnahme kommt es zur Kontraktion der Gallenblase, was dazu führt, dass die Galle über die extrahepatischen Gallengänge in das Duodenum gelangt.

1.4.2 Der enterohepatische Kreislauf

Der enterohepatische Kreislauf beschreibt die Sekretion, Absorption und Rezirkulation der Gallensäuren. Die in das Duodenum entlassenen Gallensäuren sind notwendig, damit Fette und Proteine aus der Nahrung gespalten und in eine resorbierbare Form gebracht werden. Des Weiteren sind sie notwendig, um bestimmte fettlösliche Vitamine aufzunehmen. Zudem haben sie die Aufgabe, den sauren Speisebrei aus dem Magen abzupuffern und den pH-Wert zu erhöhen, so dass die meisten Verdauungsenzyme ihr Wirkungsoptimum erreichen können. Gallensäuren zeigen zusätzlich eine antimikrobielle Wirkung, allerdings werden nicht alle Mikroorganismen durch die Gallensäuren geschädigt. Einige von ihnen sind in der Lage, die Gallensäuren zu metabolisieren und zu modifizieren, so werden insbesondere die konjugierten Gallensäuren dekonjugiert und anschließend weiter verstoffwechselt. Auf diese Weise entstehen die sekundären Gallensäuren, die dadurch, dass sie auch dem enterohepatischen Kreislauf unterliegen, dazu beitragen, dass der Gallensäurepool erweitert wird. [34]

Ein kleiner Teil der Gallensäuren wird bereits im Duodenum über passive Transportmechanismen resorbiert. Der größte Teil der Gallensäuren wird jedoch im Ileum mit Hilfe des apikalen Natrium-abhängigen Gallensäuretransporters (ASBT) aktiv in die Enterozyten aufgenommen. In den Enterozyten können die Gallensäuren mit dem intrazellulären Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) interagieren und diesen aktivieren. Dieser fördert die Expression des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 19 (FGF19), welcher wiederum von den Enterozyten in den portalen Blutstrom entlassen wird und wie ein Hormon wirken kann. Erreicht FGF19 über den Blutstrom die Leber, so kann er mit dem heterodimeren Rezeptor aus dem Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptor 4 (FGFR4) und β -Kloth interagieren. Die Aktivierung dieses Rezeptors führt über einen noch nicht ganz verstandenen Mechanismus zu einer Unterdrückung der *Cyp7a1*-Expression. Auf diese Weise wird die *de novo*-Synthese der Gallensäuren gedrosselt. [37]

Neben der indirekten Wirkung der Gallensäuren durch die Aktivierung von FXR und die darauffolgende Expression des FGF15 in den Enterozyten des Ileums werden die Gallensäuren auch direkt durch die Zellen hindurchgeschleust. Dafür wird der heterodimere organische Lösungstransporter α/β (OST α/β) benötigt, der die Gallensäuren an der basolateralen Seite der Enterozyten in den portalen Blutstrom entlässt. Über die Blutzirkulation haben die Gallensäuren einen Zugang zu allen Geweben des Körpers. [38]

Ein Teil der Gallensäuren wird in der Leber aus dem Blut mit Hilfe des NTCP in die Hepatozyten transportiert. In diesen können die Gallensäuren mit intrazellulären Rezeptoren wie dem FXR oder dem LXR interagieren. So bewirkt eine hepatische Aktivierung des FXR durch Gallensäuren eine Aktivierung des kleinen heterodimeren Proteins (SHP), welches wiederum die Expression des *Cyp7a1* Gens inhibiert [39].

Schließlich werden die Gallensäuren wieder in die Gallengänge transportiert und der Zyklus beginnt von vorne.

1.4.3 Die Rolle der Gallensäuren bei der Entstehung einer Entzündung im Verdauungstrakt

Seit einigen Jahren wird intensiv der Zusammenhang zwischen der Nahrungszusammensetzung, den Gallensäuren und dem enterischen Mikrobiom, also der Gesamtheit der im Darm vorkommenden Mikroorganismen untersucht. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf dem Einfluss dieser Faktoren auf die Manifestation einer Chronisch Entzündlichen Darmerkrankung. Für die Erforschung dieses komplexen Zusammenhangs kommen häufig murine Modelle zum Einsatz. Devkota *et al.* konnten bereits eindrucksvoll zeigen, dass die Aufnahme von besonders fetthaltiger Nahrung über die Änderung der Gallensäurezusammensetzung zu der Selektion bestimmter Bakterienspezies im Darm führt. Diese begünstigt bei einem genetisch prädisponierten Tier die Ausbildung einer Dickdarmentzündung [40]. Andere Studien konnten nachweisen, dass bereits eine kurzzeitige Nahrungsumstellung eine deutliche Änderung des enterischen Mikrobioms zur Folge hat [41]. Nicht nur die Zusammensetzung des Mikrobioms wird durch eine Nahrungsumstellung beeinflusst, auch die Physiologie der Bakterien, in Form von veränderten Stoffwechselwegen, ändert sich unter diesen Umständen [42]. Ebenso hat eine intestinale Entzündung einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Mikrobioms [43] und des Gallensäurepools [44]. Diese Ausführungen zeigen, dass bereits die Änderung eines Faktors tiefgreifende Folgen auf alle anderen Einflussgrößen haben kann. Diese Tatsache erschwert die Herstellung von

kausalen Zusammenhängen in Bezug auf die Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen deutlich.

1.5 Experimentelle Mausmodelle einer PSC

1.5.1 Die *Mdr2*^{-/-} (*Abcb4*^{-/-}) Maus

Die *Mdr2*^{-/-} Maus ist ein etablierter Modellorganismus zur Erforschung der Primär Sklerosierenden Cholangitis sowie des hepatozellulären Karzinoms. Bereits kurze Zeit nach der Geburt entwickeln die Tiere eine chronische Hepatitis, der konsekutiv eine Leberfibrose, bis hin zur Leberzirrhose, folgt. [45]

Bei dem *Mdr2* (*Abcb4*)-Gen, dessen humanes Homolog dem *Mdr3*-Gen entspricht, handelt es sich um ein ATP-abhängiges Transportprotein aus der Familie der P-Glykoproteine, das für den Transport von Phospholipiden, insbesondere Phosphatidylcholin, in die Gallengänge verantwortlich ist. Durch einen reduzierten Phospholipidgehalt in den Gallengängen kommt es zu einer unzureichenden Lösung der Gallensäuren. Dies führt lokal zu sehr hohen Gallensäurenkonzentrationen, die wiederum einen toxischen Effekt auf das sie umgebende Gallengangsepithel haben. Auf diese Weise entsteht eine sterile, chronische Entzündung in unmittelbarer Nähe zu den Gallengängen. [45-47]

Histopathologisch zeigt sich ein Bild der periduktalen Fibrosierung, vergleichbar mit den histopathologischen Auffälligkeiten, die bei der PSC zu beobachten sind. Des Weiteren sind die Serumtransaminasen (ALT, AST) und das Bilirubin im Vergleich zu Wildtyp Mäusen erhöht [46]. Dabei fällt eine gewisse Fluktuation der Transaminasenwerte auf, die im Sinne einer zeitlich variabel ausgeprägten Entzündungsaktivität zu verstehen sind. Darüber hinaus sind bei den *Mdr2*^{-/-} Mäusen sowohl pro-inflammatorische als auch pro-fibrotische Gene dauerhaft erhöht [45].

1.5.2 Das DDC-Modell als chemisch induziertes Modell für die PSC

Bei dem DDC-Modell handelt es sich um ein chemisch induziertes Modell für die PSC. In der Regel werden Wildtyp Mäuse mit Futter, das mit Diethyl-1,4-Dihydro-2,4,6-trimethyl-3,5-pyridinedicarboxylat (DDC) versetzt wurde, gefüttert. Bereits nach einer Behandlungswoche lassen sich bei den Tieren erste reaktive Veränderungen in der Leber erkennen. Im weiteren Verlauf zeigen die Tiere histopathologische Veränderungen der Leber, die denen der menschlichen Erkrankung stark ähneln. Ähnlich wie bei den *Mdr2*^{-/-} Mäusen kommt es in diesem Modell ebenfalls zu einer Erhöhung der Lebertransaminasen und der Cholestaseparameter. [48]

1.6 Experimentelle Kolitis-Modelle und ihre Verbindung mit dem PSC-Modell

1.6.1 Die DSS-Kolitis als chemisch induzierte Dickdarmentzündung

Für die Induktion einer Chronisch Entzündlichen Darmerkrankung im Mausmodell wurde das ursprünglich von Okayasu *et al.*[49] beschriebene Dextran-Natrium-Sulfat-Kolitis-Modell (DSS-Kolitis) gewählt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht abschließend geklärt, auf welche Weise die Chemikalie zu einer Entzündung insbesondere des distalen Abschnitts des Dickdarms führt. Vermutet wird, dass das DSS durch die Bildung von Nano-Lipidkomplexen mit mittellangen Fettsäuren die Membranen der Kolonepithelien überwinden kann [50] und so auf noch unbekannte Weise zu einer Auflösung der epithelialen Integrität führt. Somit ist es möglich, dass Bakterien oder ihre Bestandteile die Submukosa erreichen und dort zu einer Entzündung führen. Von den klinischen Aspekten betrachtet, entspricht die DSS-Kolitis denen der Colitis ulcerosa mit einem primär im distalen Abschnitt des Kolons gelegenen Befallsmuster, blutig-schleimiger Diarrhö sowie histopathologischen Kryptenabzessen [51]. Die Ausprägung und der Verlauf der Kolitis werden durch die Konzentration und die Applikationsdauer beeinflusst. So ist es möglich, eine akute Dickdarmentzündung zu induzieren oder durch repetitive DSS-Gabe den chronischen Verlauf einer CED zu simulieren [52].

1.6.2 Adaptiver Transfer von Effektor-T-Helferzellen zur Induktion einer Dickdarmentzündung

Für die Erforschung Chronisch Entzündlicher Darmerkrankungen im Mausmodell sind neben den chemisch-induzierten Modellen wie der DSS-Kolitis oder infektiösen Modellen wie der Infektion mit *Citrobacter rodentium*, auch Modelle entwickelt worden, bei denen durch adaptiven Transfer von T-Zellen in eine immundefiziente Empfängermaus eine Entzündung primär im Dickdarm entsteht. Die CD45RB^{high}-Kolitis ist das am häufigsten verwendete und am besten beschriebene Modell [53]. Bei diesem Modell werden zuvor isolierte naive CD4⁺ T-Lymphozyten auf Grund der Stärke ihrer CD45RB Expression an ihrer Zelloberfläche mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung voneinander getrennt und anschließend in einen lymphopenen Empfänger wie beispielsweise eine *Rag1*^{-/-} Maus transferiert. Dabei führt der Transfer von CD4⁺ T-Zellen, die CD45RB stark exprimieren, zu einer Entzündung im Dickdarm des Empfängertiers, während Tiere, die CD4⁺ T-Zellen mit geringer Expression von CD45RB erhalten, weitestgehend nicht von einer Entzündung des Dickdarms betroffen sind [54]. Dieses Kolitis-Modell wurde in den letzten Jahren stark beforscht, um den

Mechanismus, der hinter dieser Entzündung steht, zu verstehen. So wird nach wie vor darüber diskutiert, ob T_H1 Zellen, welche überwiegend INF γ produzieren, oder T_H17 Zellen, welche überwiegend IL-17A, IL-17F und IL-22 produzieren, für die Entwicklung der Darmentzündung verantwortlich sind. Die Tatsache, dass es neben diesen beiden klar definierten T-Zell-Klassen auch noch T-Zellen gibt, die sowohl IL-17A als auch INF γ produzieren, lässt vermuten, dass eine gewisse Plastizität in der Entwicklung der Effektor T-Zellen besteht [55-58]. Die Zusammensetzung des umgebenden Milieus hat einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung von T_H17 Vorläuferzellen in die unterschiedlichen Effektorzellpopulationen. Von besonderer Bedeutung sind dabei in erster Linie IL-12, IL-23 und TGF- β [55, 59-62]. Alternativ zu der RB^{high}-Kolitis besteht die Möglichkeit, eine Dickdarmentzündung durch den Transfer von *in vitro* differenzierten T_H17 Zellen zu induzieren [57].

1.6.3 Citrobacter Kolitis

Citrobacter rodentium war ursprünglich als *Citrobacter freundii* Biotyp 4280 bekannt. Dabei handelt es sich um ein gramnegatives, fakultativ anaerobes, mesophiles Stäbchenbakterium, das zur Familie der Enterobacteriaceae gehört. *C. rodentium* kommt als Bestandteil der Darmflora vor und ist ein spezifischer Darmkeim von Mäusen. Er bildet das murine Äquivalent zu den humanpathogenen *E. coli* EHEC oder EPEC [63]. Aus diesem Grund dienen Infektionen von Mäusen mit *C. rodentium* als Modell für humane Infektionen mit EHEC oder EPEC. Infektionen mit diesem Keim führen insbesondere im Bereich des Kolons zur Kryptenhyperplasie, dem Verlust von Becherzellen sowie Erosionen der Mukosa [64]. Diese infektiöse Form der Darmentzündung hat sich im Laufe der Jahre als nützliches Werkzeug für die Erforschung von T_H17 Zellen erwiesen. Ivanov *et al.* konnten nachweisen, dass das Vorhandensein von T_H17 Zellen vor einer Infektion mit *Citrobacter rodentium* schützt [65]. Aber auch die Infektion mit *C. rodentium* selbst führt über die Adhäsion des Bakteriums an das Darmepithel zu einer Induktion von T_H17 Zellen [66].

In dieser Arbeit wurde diese Form der Kolitis genutzt, um den Einfluss von T_H17 zell-abhängigen Darmentzündungen auf die Entwicklung einer Leberpathologie zu untersuchen.

1.7 Die *Kaede* Maus zur Studie von Zellmigration

Um das Migrationsverhalten von Zellen *in vivo* untersuchen zu können, wurde von Tomura *et al.* die *Kaede* transgene Maus entwickelt [67]. Dabei handelt es sich um eine transgene Maus, die unter der Kontrolle des CAG-Promotors das ursprünglich aus Korallen stammende KAEDE-Protein in allen Körperzellen exprimiert. Bei dem KAEDE-Protein handelt es sich um ein grün fluoreszierendes Protein, das nach der Bestrahlung mit elektromagnetischer Strahlung aus dem Spektrum des UV-Lichtes eine irreversible Konformationsänderung erfährt [68]. Diese Konformationsänderung wird als Photokonversion bezeichnet und führt dazu, dass das Protein nun rot fluoresziert. Die Änderung des Fluoreszenzverhaltens lässt sich fluoreszenzmikroskopisch oder in der Durchflusszytometrie messen [67]. Durch die organspezifische Exposition mit UV- bzw. violetten Licht (350-410 nm) ist es möglich, das Migrationsverhalten von Zellen *in vivo* zu studieren [67, 69, 70]. Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist das Migrationsverhalten von Immunzellen während einer Dickdarmentzündung. Dabei sollten insbesondere die Fragen geklärt werden, ob a) Zellen aus den entzündeten Bereichen des Darms in die Leber migrieren und b) dieses Migrationsverhalten durch eine zuvor bestehende Lebererkrankung beeinflusst wird.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zwei Hypothesen getestet werden.

Hypothese I: Eine Kolitis begünstigt die Entwicklung einer PSC durch Immunzellen, die im Darm aktiviert werden, über die Pfortader in die Leber gelangen und dort zu einer Entzündung der Gallengänge führen. Hierbei sollte untersucht werden, ob und wenn ja, welche Zellen im Rahmen einer Dickdarmentzündung aus dem Darm in die Leber migrieren. Für die Beantwortung dieser Fragen wurden chemische (DSS) wie auch T-Zell-abhängige (Transfer-Kolitis) und infektiöse (*Citrobacter rodentium* Infektionen) Modelle für Darmentzündungen in Wildtyp Mäusen sowie bei Mausmodellen für die PSC (*Mdr2*^{-/-}, DDC) verwendet und ihre Auswirkungen auf die Entstehung bzw. den Verlauf einer bereits existierenden Hepathopathie untersucht. Für die Untersuchung des Migrationsverhaltens von verschiedenen Immunzellpopulationen wurde die transgene *Kaede* Maus verwendet. Hierfür wurde bei den Tieren zunächst eine DSS-Kolitis induzierte und anschließend eine endoskopische Photokonversion im Dickdarm durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Detektion und Immunphänotypisierung der photokonvertierten Zellen in verschiedenen Organen mit einem besonderen Fokus auf die Leber.

Hypothese II: Die PSC begünstigt die Entstehung einer Kolitis durch die Änderung des Mikrobioms, die durch eine Änderung der Gallensäurezusammensetzung vermittelt wird. Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine Analyse der Gallensäurezusammensetzung in der Leber und dem Stuhlgang von Wildtyp und *Mdr2*^{-/-} Mäusen unter homöostatischen sowie Bedingungen einer DSS-Kolitis untersucht. Zusätzlich erfolgte die Analyse von wichtigen Schlüsselenzymen, die an der Gallensäuresynthese beteiligt sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material- und Geräteliste

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
BD Discardit™ II Spritzen 5ml, 10ml, 20ml	BD Biosciences, Heidelberg
Einbettkassetten	Kabe Labortechnik, Nümbrech
Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5ml; 2,0ml	Eppendorf AG, Hamburg
Feindosierungsspritzen, 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Glaskapillaren	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Greiner centrifuge tubes 15ml, 50ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Objektträger SuperFrost/Plus	Karl Hecht KG, Sondheim
Pipettenspitzen ohne Filter 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sterile Einmalkanüle 26G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Reagenz	Hersteller
Agarose SeaKem LE	Lonza, Köln
Ammoniumchlorid	TH Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Collagenase aus Clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	TH Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
DEPC-behandeltes Wasser	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dextran-Sodium-Sulfat (36000-50000 Da)	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Dinatriumhydrogenphosphat	TH Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
DMEM (1x) + GlutaMAX- Medium	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Eosin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Eukitt Eindeckmedium	O. Kindler GmbH, Freiburg
Ethanol 96 Vol.%, vergällt	Walter CMP GmbH & Co. KG, Kiel
Ethanol 96 Vol.%	Merck, Darmstadt KGaA

Material und Methoden

Ethylendiamintetraessigsäure	TH Geyer Gmbh & Co. KG, Renningen
Fetales Kälberserum	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Formaldehydlösung, 36,5%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hämatoxylin	Carl Roth, Karlsruhe
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, Steinheim
IMDM	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ionomycin Calciumsalz	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Isofluran	
Isopropanol	TH Geyer Gmbh & Co. KG, Renningen
Kaliumchlorid	TH Geyer Gmbh & Co. KG, Renningen
Kaliumdihydrogenphosphat	TH Geyer Gmbh & Co. KG, Renningen
Kaliumhydrogencarbonat	TH Geyer Gmbh & Co. KG, Renningen
Ketamin	Gräub Albrecht, Aulendorf
Lympholyte-M	Cedarlane, Burlington (Ontario), Kanada
Methanol	Avantor Materials B.V., Deventer, Niederlande
Monensin-Lösung (1000x)	Biologend, London, England
Natriumacetat	Avantor Materials B.V., Deventer, Niederlande
Natriumchlorid	TH Geyer Gmbh & Co. KG, Renningen
Natriumhydroxid	TH Geyer Gmbh & Co. KG, Renningen
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pen Strep (Penicillin + Streptomycin)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Percoll	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Phorbol-12-myristate-13-acetate	Merck, Darmstadt KGaA
Phosphatgepufferte Salzlösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure, rauchend	TH Geyer Gmbh & Co. KG, Renningen
Streptavidin MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
TRIzol Reagenz	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Trypanblau 0,4 %-Lösung	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Xylazin (Rompun) 2% Injektionslösung	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Xylol	O. Kindler GmbH, Freiburg

Tabelle 3: Verwendete FACS-Antikörper

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	PE-Cy7	Biolegend, London, England
CD11c	HL3	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD19	6D5	APC-Cy7	Biolegend, London, England
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	Biolegend, London, England
NK1.1	PK136	PE-Cy7	Becton Dickinson, Heidelberg
IFN	XMG1.2	APC	Biolegend, London, England
IFN	XMG1.2	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
IL17a	TC11-18H10.1	Alexa Fluor 488	Biolegend, London, England
IL17a	TC11-18H10.1	Alexa Fluor 647	Biolegend, London, England
Foxp3	NRRF-30	PE	eBioscience
B220	RA3-6B2	PerCP	Biolegend, London, England
B220	RA3-6B2	BV605	Biolegend, London, England

Tabelle 4: Verwendete Zytokine für die *in vitro* Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen

Zytokin	Hersteller
IL2	PeptoTech GmbH, Hamburg
IL6	Biolegend, London, England
IL12	PeptoTech GmbH, Hamburg
IL23	Biolegend, London, England
IL1	R&D Systems, Minneapolis, USA
TNF	1 R&D Systems, Minneapolis, USA

Tabelle 5: RT-PCR-Primer und die entsprechende Assay ID der Firma Thermo Fisher Scientific

Zielgen	Assay ID
<i>Il6</i>	Mm00446190_m1
<i>Il17a</i>	Mm00439618_m1
<i>Ifng</i>	Mm01168134_m1
<i>Tnfa</i>	Mm00443258_m1
<i>Col1a1</i>	Mm00801666_g1
<i>Acta2</i>	Mm00725412_s1
<i>Timp1</i>	Mm00441818_m1
<i>Cyp7a1</i>	Mm00484150_m1
<i>Cyp8b1</i>	Mm00501637_s1
<i>Mmp8</i>	Mm00439509_m1
<i>Hprt</i>	Mm03024075_m1
<i>Shp</i>	Mm00442278_m1
<i>Fxr</i>	Mm00436425_m1

Tabelle 6: Verwendete Kits

Kit	Herstelle
High capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dynabeads mRNA DIRECT	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Tabelle 7: Primer Sequenzen für die verwendeten Genotypisierungs-PCR

Zielgen	Primername	Primer Sequenz
<i>Rag1</i>	Rag1WTF	GAG GTT CCG CTA CGA CTC TG
	Rag1R	CCG GAC AAG TTT TTC ATC GT
	Rag1MF	TGG ATG TGG AAT GTG TGC GAG
<i>Mdr2</i>	MDR2fwd	CCA CAG CCA CAC ACT GAC CT
	MDR2wtrev	CAT CAA ACC ACG TGC AGA AAA
	MDR2mrev	CCA GAC TGC CTT GGG AAA AG
<i>Foxp3</i> -mRFP-KI	FIR1	CAA AAC CAA GAA AAG GTG GGC
	FIR2	GGA ATG CTC GTC AAG AAG ACA GG
	FIR3	CAT CTT GGA GAG TCG GTG TG
<i>Ifng</i> -FP635-KI	SCIFNF1	GCC CAA CAA CTT GTA TAC TTG GA
	SCIFNF2	CGC AAT CAC AGT CTT GGC TA
	SC TURBO F2	GCC CTG TGA TGC AGA AGA A
<i>Il17a</i> -eGFP-KI	IL-17A KI sense	CAC CAG CGC TGT GTC AAT
	IL-17A KI anti sense	ACA AAC ACG AAG CAG TTT GG
	IL-17A KI IRES	ACC GGC CTT ATT CCA AGC

2.1.2 Zusammensetzung verwendeter Puffer

10xACK-Puffer: NH₄CL 150 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 1 µM, in ddH₂O

FACS-Puffer: 2,5% FCS, 0,03% NaN₃, in 1xPBS

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 1xPBS, sterilfiltriert

Medium komplett: 10% FCS, 1% PenStrep, in DMEM GlutaMAX

2.1.3 Gerätschaften

Tabelle 8: Verwendete Gerätschaften

Gerät	Hersteller
BlueWave® LED Prime UVA Punktstrahler	Dymax Europe GmbH, Wiesbaden
CO2-Inkubator MCO-19AIC (UVH)	Sanyo medical AG, Etten Leur, Niederlande
Durchflusszytometer: LSR II	BD Biosciences, Heidelberg
Endoskop: ColoView-System	Karl Storz, Tuttlingen
FACS Aria III	BD Biosciences, Heidelberg
MACS Magnet: QuadroMACS Seperator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Magnet für RNA-Isolation: DynaMag-2	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Mikroskop Keyence BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg
Mikrotom CUT 5062	SLEE medical, Mainz
Neubauer Zählkammer bright line	Marienfeld Superior, Lauda Königshofen
Pipetten 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Präparationsbesteck	Fine science tools, Heidelberg
Real-Time-PCR-Cycler: Step One Plus	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Reine Werkbank HA 2472	GS Heraeus Holding GmbH, Hanau
Spektrophotometer Nanodrop 2000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermozykler C100 Touch	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Wasserbad WNB	Memmert GmbH und Co.KG, Schwabach
Zentrifuge: Centrifuge 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge: Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg

2.2 Verwendete Mauslinien

2.2.1 Rechtliche Voraussetzungen

Alle durchgeführten Versuche wurden vom Amt für Verbraucherschutz der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz Hamburg mit den Anträgen auf die Durchführung eines Tierversuchsvorhaben 35/13 und 100/12 genehmigt. Während der Versuche wurde stets darauf geachtet, eine möglichst geringe Belastung für die Tiere entstehen zu lassen. Erfüllten Tiere die in den Anträgen definierten Bedingungen für einen Abbruch, so wurden diese Tiere von dem Versuch ausgeschlossen und unmittelbar euthanasiert.

2.2.2 Versuchstiere

Tabelle 9: Verwendete Mauslinien

Linie	Beschreibung
C57B6/J	Wildtyp
<i>Mdr2</i> ^{-/-}	homozygoter knock out des <i>Abcb4</i> Gens
<i>Rag1</i> ^{-/-}	homozygoter knock out des <i>recombination activation gen 1</i>
<i>Rag1</i> ^{-/-} <i>Mdr2</i> ^{-/-}	homozygoter Doppel knock out für das <i>recombination activation gen 1</i> und das <i>Abcb4</i> Gen
<i>Kaede</i>	Transgene Maus die ubiquitär das KAEDE grün Protein exprimiert
Tripelreporter	Koexpression von Fluoreszenzfarbstoffen für <i>Foxp3</i> , <i>Il17a</i> und <i>Ifng</i> (<i>Foxp3</i> -mRFP-KI; <i>Il17a</i> -eGFP-KI, <i>Ifng</i> -FP635-KI)

Die Eigenschaften der *Mdr2*^{-/-} und *Kaede* Maus wurden bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben. *Rag1*^{-/-} Mäuse sind Tiere, die auf Grund eines *knock out* des V(D)J Rekombinase aktivierten Gens (*Rag1*) keine reifen T- oder B-Zellen besitzen. Die Differenzierung dieser Immunzellen wird bereits während der frühen Entwicklung unterbrochen. *Rag1*^{-/-} Mäuse weisen kleine lymphoide Organe auf, die keine B- oder T-Zellen enthalten.[71]

Triple-Reporterermäuse sind Tiere, die bei der Expression von bestimmten Genen die regulären Genprodukte in Kombination mit einem fluoreszierenden Protein exprimieren. Aus gentechnischer Sicht handelte es sich bei diesen zusätzlichen Genprodukten um einen *knock in*. Für die durchgeführten Versuche wurden folgende Tiere verwendet: *Foxp3*-mRFP, *Il17a*-eGFP und *Ifng*-FP635 [72] [73].

2.2.3 Zucht- und Haltungsbedingungen

Die Versuchstiere wurden unter spezifischen, pathogen-freien Bedingungen in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf gehalten. Die Licht- und Dunkelphase der Tiere betrug jeweils 12 Stunden. Wenn nicht anders durch das Versuchsvorhaben beschrieben, wurden die Käfige, das Futter und das Wasser einmal wöchentlich gewechselt. Die Tiere wurden in der Zucht- und Haltung der Versuchstierhaltung gezüchtet und die Nachkommen mindestens 4 Wochen vor Versuchsbeginn in die entsprechenden Versuchsanlagen in der Versuchstierhaltung transferiert.

2.2.4 Genotypisierung

Um sicherzugehen, dass die gezüchteten Tiere auch den gewünschten Genotyp aufwiesen, wurden Schwanzbiopsien der Tiere auf die entsprechenden Gene analysiert. Die Biopsien wurden in 83 µl eines Gemischs aus ProteinaseK-Puffer und ProteinaseK bei 55°C für mindestens 4 Stunden im Wasserbad inkubiert. Um die enzymatischen Reaktionen zu stoppen, wurden die Biopsien für 15 Minuten auf 95°C erhitzt. Abschließend wurden die Proben mit 300 µl Wasser aufgefüllt und bis zum nächsten Gebrauch kurzzeitig bei 4°C oder bei längerer Lagerung bei -20°C bewahrt.

Für die Durchführung der Genotypisierungs-PCR wurde zunächst ein PCR-Mastermix angefertigt. Dieser enthielt pro Ansatz jeweils 0,3 µl dNTPS, 9,74 µl Wasser, 1,5 µl 10xDreamTaq-Puffer, 0,11 µl DreamTaq (U/l), 0,45 µl Primer 1, 0,45 µl Primer 2 und 0,45 µl Primer 3. Bei PCR-Ansätzen, die nur zwei Primer benötigten, wurde das Volumen des dritten Primer entsprechend durch Wasser ersetzt. Die Primersequenzen sind der Tabelle 7 zu entnehmen. Jeweils 13 µl des PCR-Ansatzes wurden in einem PCR-Reagiergefäß vorgelegt und anschließend 2 µl DNA der Schwanzbiopsien hinzugefügt. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Tabelle 10: PCR-Programm für die Durchführung der Genotypisierungs PCR

Stufe	Temp. [°C]	Dauer
1	94	3'
2	94	40 sec
3	65 (-0.3°C/Zycle)	40 sec
4	72	40 sec
5	35 x Stufe 2	
6	72	5'
7	15	forever

Im Anschluss folgte eine elektrophoretische Auftrennung der DNA-Sequenzen mittels Agarosegel. Dafür wurde der PCR-Ansatz auf ein 1,5%-iges Agarosegel, das 1:20.000 verdünntes Gelred enthielt, aufgetragen und die Banden bei 550 V für 30-45 Minuten aufgetrennt. Die Visualisierung der Banden im Gel erfolgte mit dem Gel Doc™ XR+ System.

2.3 Mausmodelle einer PSC und einer Kolitis

2.3.1 Akute und chronische DSS-Kolitis

Für die Induktion einer akuten Dickdarmentzündung erhielten die Tiere über einen Zeitraum von sieben Tagen 2,5 % DSS im Trinkwasser *ad libitum*. Anschließend wurde das DSS-Trinkwasser durch autoklaviertes Wasser ersetzt und die Tiere am neunten Tag des Experiments euthanasiert. Drei Tage nach Beginn der DSS-Behandlung wurden die Tiere täglich gewogen und am achten Tag zusätzlich endoskopiert.

Die Induktion einer chronischen DSS-Kolitis erfolgte in drei Zyklen. Während der ersten beiden Zyklen erhielten die Tiere jeweils über einen Zeitraum von fünf Tagen 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser, im dritten Zyklus über einen Zeitraum von sieben Tagen. Zwischen den jeweiligen Zyklen lag stets ein Zeitraum von 16 Tagen, in dem sich die Mäuse von der Entzündung erholten. Jeweils einen Tag nach Absetzen des DSS wurden die Tiere endoskopiert. Während des gesamten Experiments erfolgten regelmäßig Gewichtskontrollen. Zwei Tage nach Absetzen des DSS des dritten Zyklus wurden die Tiere euthanasiert.

2.3.2 Adaptiver Transfer von T-Zellen zur Induktion einer Dickdarmentzündung

Für die Induktion der Dickdarmentzündung durch den adaptiven Transfer von *in vitro* differenzierten T-Helferzellen, wurden zunächst naive CD4⁺ T-Helferzellen aus den lymphatischen Organen von Triple-Reportermausen isoliert und anschließend *in vitro* zu den unterschiedlichen T-Helferzellsubklassen differenziert. Nach erfolgter Kultivierung und anschließender durchflusszytometrischer Zellsortierung, wurden die Zellen auf eine Konzentration von $0,5-1 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt und jeweils 200 µl Zellsuspension pro *Rag1*^{-/-} Empfängermaus intraperitoneal (*i.p.*) injiziert. Vor dem Zelltransfer wurde das Ausgangsgewicht der Empfängermäuse bestimmt. Es erfolgten regelmäßige Gewichtskontrollen sowie ab der dritten Woche einmal wöchentlich eine endoskopische Kontrolle der Kolitisausprägung. Der Versuch wurde beendet, wenn die Tiere entweder einen durchschnittlichen Kolitis-Score von 6-7 Punkten erreicht hatten, oder das Gewicht bei weniger als 80 % des Ausgangsgewichts lag.

2.3.3 Citrobacter Kolitis

Zunächst wurden die *Citrobacter rodentium* Kulturen aus der Bakterienbank über Nacht bebrütet. Dafür versetzte man 100 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Nalidinsäure und fügte anschließend die Bakterien hinzu. Die Inkubation erfolgt bei 37° C im Schüttelinkubator. Am nächsten Tag wurde das Medium in 50 ml Zentrifugiergefäße transferiert und für 10 Minuten

bei 3000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Als Nächstes folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 50 ml 1xPBS und einer anschließenden Zentrifugation für jeweils 10 Minuten bei 3000 g und Raumtemperatur. Im Folgenden wurden die Pellets in insgesamt 20 ml 1xPBS resuspendiert und zusammengefügt. Zur Bestimmung der Bakterienkonzentration in der Lösung erfolgte die OD₆₀₀ Bestimmung mit Hilfe einer Serienverdünnung (1:5, 1:25, 1:125, 1:625). Anschließend wurde die Lösung auf eine Konzentration von 5x10⁹ Bakterien/ml eingestellt. Die Inokulation der Mäuse per Gavage erfolgte mit jeweils 200 µl Bakterienlösung. Die Kontrollgruppe erhielt 200 µl 1xPBS.

Um den Krankheitsverlauf zu beobachten, wurden die Tiere regelmäßigen klinischen Kontrollen unterzogen. Sieben Tage nach der Inokulation erfolgt die Organentnahme zur weiteren Analyse.

2.3.4 Diethyl-1,4-Dihydro-2,4,6-trimethyl-3,5-pyridinedicarboxylat (DDC) als Chemisch induziertes Modell für eine PSC

Für die chemische Induktion eines PSC-ähnlichen Phänotyps in der Leber, wurde das DDC-Modell verwendet. Hierzu erhielten Wildtyp Mäuse über einen Zeitraum von einer bis vier Wochen *ad libitum* 0,1 % DDC enthaltenes Futter. Für die Herstellung des Futters wurde 1 kg herkömmliches Trockenfutter mit 1 g DDC und 500 ml Leitungswasser vermischt. Anschließend wurde die Futtermasse etwa 1,5 cm dick auf einer mit Folie beschichteten Unterlage ausgebreitet. Damit das Futter besser trocknen konnte, wurde die Masse mit einem Skalpell in ca. 4x4 cm große Stücke geschnitten und anschließend unter einen Abzug zum Trocknen gestellt. Die Plätzchen wurden täglich zweimal gewendet, bis diese vollständig getrocknet waren und bis zum weiteren Gebrauch vor Licht geschützt bei 4° C gelagert.

2.4 Knochenmarkschimären

Um die Rolle von hämatopoetischen Zellen für den beobachteten Phänotyp zu analysieren, wurden verschiedene Knochenmarkstransplantationen durchgeführt. Dabei dienten *Mdr2*^{-/-} Mäuse stets als Rezipienten und unterschiedliche *knock out* oder transgene Mäuse als Knochenmarksdonoren.

Zunächst mussten die Rezipienten im Alter von 6-8 Wochen letal bestrahlt werden. Dafür wurden die Tiere mit dem Biobeam 2000 mit einer Gesamtdosis von 9 Gy in Form einer Ganzkörperbestrahlung ausgesetzt. Die Bestrahlung erfolgte fraktioniert mit 2x4,5 Gy/Bestrahlung. Zwischen den einzelnen Fraktionen lag ein Zeitraum von vier Stunden. Damit eine möglichst vollständige Zerstörung des Knochenmarks gewährleistet war und um die Abstoßung gegen das Spenderknochenmark so gering wie möglich zu halten, wurde das Spenderknochenmark 24 Stunden nach der Bestrahlung transferiert.

Zur Isolation des Spenderknochenmarks wurde den Spendermäusen der Femur und die Tibia entnommen und diese vorsichtig von Muskel- und Bindegewebe befreit.

Mit einer chirurgischen Schere wurden die Knochen an beiden Seiten schaftnah durchtrennt und das enthaltene Knochenmark mit Hilfe einer 26 G Kanüle und einer mit sterilem PBS gefüllten Spritze herausgespült. Das Knochenmark wurde in einer Petrischale aufgefangen, resuspendiert und anschließend durch ein 100 µm Zellsieb gefiltert. Das Filtrat wurde in einem 50 ml Zentrifugationsgefäß aufgefangen und anschließend mit sterilem PBS auf 50 ml aufgefüllt. Es folgte ein fünf-minütiger Zentrifugationsschritt bei 4° C und 350 rcf. Der Überstand wurde verworfen und eine Erythrozytenlyse mit 1 ml sterilem 1xACK-Puffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde das Reagiergefäß mit sterilem PBS aufgefüllt und zu gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5 ml sterilem 1xPBS resuspendiert. Zur Zellzahlbestimmung mittels Neubauerzählkammer erfolgte die Entnahme von 20 µl der Zellsuspension. Anschließend wurde diese mit sterilem PBS auf eine Endkonzentration von 20*10⁶ Zellen/ml eingestellt.

Die Empfängermause wurden einen Tag nach der Bestrahlung zunächst mit Isofluran narkotisiert, anschließend wurden 100 µl des KM retrobulbär 100 µl (10⁶ Zellen) *i.v.* injiziert. Für den Zeitraum der Repopulation (6 Wochen) wurden die Mäuse mit 3,5 ml (240 mg / 5 ml) Sulfamethoxazol und Trimethoprim (Cotrim K) in 250 ml autoklavierten Leitungswasser antibiotisch gegen Infektionen abgeschirmt. Mindestens 2 Wochen nach Absetzen des

Antibiotikums mussten vergehen, bevor Versuche mit den transplantierten Mäusen durchgeführt werden konnten.

2.5 Kleintier-Endoskopie und UV-Photokonversion im Kolon

2.5.1 Kleintierendoskopie

Um die Ausprägung der Darmentzündung klinisch zu beurteilen wurden die Tiere, bei denen eine Dickdarmentzündung induziert wurde, eine Endoskopie mit Hilfe eines Kleintierendoskops der Firma Karl Storz durchgeführt. Zur makroskopischen Beurteilung wurde das von Becker *et al.* [74] vorgeschlagene Scoring-System verwendet. Dabei wurde die Granularität, die Transparenz, der Fibrinbelag, die Stuhlkonsistenz und die Vaskularisierung des Dickdarmgewebes mit einem Punkte System von jeweils 0-3 versehen. Wobei 0 vollständig gesund und 3 maximal mögliche Erkrankungsausprägung bedeutete.

Um die Endoskopie durchführen zu können, mussten die Tiere zunächst mit Isofluran anästhesiert und anschließend das Endoskop über den Anus bis zur linken Flexur des Kolons vorgeschoben werden. Beim vorsichtigen Herausziehen des Endoskops wurden alle Punkte des Scoring-Systems berücksichtigt und notiert. Die Endoskopie erfolgte verblindet.

2.5.2 UV-Photokonversion im Kolon mittels Endoskop

Das Migrationsverhalten von Immunzellen aus dem Kolon wurde mit Hilfe der *Kaede* Maus untersucht. Für die UV-Photokonversion im Kolon wurde die Lichtquelle des Kleintierendoskops durch eine UV-Lichtquelle ersetzt [69]. Wie bereits für die Endoskopie beschrieben, wurden die Tiere zunächst anästhesiert und anschließend das Endoskop über den Anus vorsichtig bis zur linken Flexur des Kolons vorgeschoben. Mit Erreichen der Flexur wurde das UV-Licht eingeschaltet und das Endoskop alle 30 Sekunden etwas zurückgezogen. Somit ergab sich eine gesamte Bestrahlungszeit von 3 Minuten pro Maus. Zwei Tage nach erfolgter Photokonversion wurden die Tiere der Analyse zugeführt.

2.6 Analyse von Gallensäuren aus Gewebe und Stuhl

Die Analyse der Gallensäuren erfolgte freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Jörg Heeren des Instituts für Biochemie und molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf. Für Gewebeanalysen wurden jeweils ein Leberlappen bzw. die Gallenblase vorsichtig entnommen, in ein Cryogefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Trockeneis gelagert. Für die Analyse der Gallensäuren aus Stuhlgang, wurde dieser vorsichtig nach Entnahme des Kolons von der oralen Seite bis zur analen Seite herausgedrückt und in einem Cryogefäß aufgefangen. Auch die Stuhlproben wurden bis zur weiteren Verwendung auf Trockeneis bzw. bei -80°C gelagert.

2.7 Zellisolation

2.7.1 Leukozytenisolation aus Kolongewebe

Für die Isolation von Leukozyten aus Kolongewebe wurde das Gewebe nach der Organentnahme zunächst longitudinal mit einer chirurgischen Schere aufgeschnitten und zweimal in einem Bad mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Darmgewebe in ein 15 ml Reagiergefäß, das 10 ml DEMEM-Medium mit je 1 % FBS, Penicillin und Streptomycin enthielt, transferiert und 20 µl einer 0,5 M EDTA-Lösung hinzugefügt. Das Gewebe wurde für 20 Minuten bei 37° C im Inkubator oder Wasserbad geschüttelt. Die nun in dem Medium enthaltenen intraepithelialen Leukozyten (IEL) wurden durch Abschütten des Mediums in ein 50 ml Reagiergefäß überführt. Das Gewebe wurde zweimal mit jeweils 8 ml einer 1xPBS 1 % FBS Lösung gewaschen.

Um die Leukozyten der Lamina Propria (LPL) zu isolieren, wurde das Gewebe aus dem Reagiergefäß auf eine Petrischale transferiert und mit einer gebogenen Schere so lange zerkleinert, bis keine zusammenhängenden Gewebestücke mehr zu sehen waren. Das auf diese Weise zerkleinerte Gewebe wurde anschließend in ein 15ml Reagiergefäß überführt, das 6 ml DMEM-Medium mit 1 % FBS 1 % Penicillin und Streptomycin sowie jeweils 60 µl DNase (10 U/ml) und Kollagenase (0,18 U/ml) enthielt. Es folgte eine Inkubationszeit von 45 Minuten bei 37° C im Schüttelinkubator.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Suspension in ein 150 µm Metallsieb überführt und mit dem Stempel einer 5 ml Spritze durch die Maschen des Siebs gerieben. Das Reagiergefäß, in dem die Inkubation stattgefunden hatte, wurde zweimal mit 1xPBS 1% FBS ausgewaschen. Die isolierten Zellen wurde in einer Petrischale aufgefangen, mit den IELs zusammengefügt und mit 400 rcf bei 4° C für 10 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 4 ml einer 40 %igen Percoll-Lösung resuspendiert. Die Lösung wurde anschließend in ein 15 ml Zentrifugationsgefäß gegeben, das bereits 4 ml einer 67 %igen Percoll-Lösung enthielt. Es folgte eine 20-minütige Dichtegradientenzentrifugation bei 400 rcf und Raumtemperatur. Es wurde die niedrigste Stufe für die Beschleunigung und Bremse gewählt.

Die sich in der Interphase befindlichen Leukozyten wurden vorsichtig mit einer 1000 µl Pipette aufgenommen und in ein 50 ml Reagiergefäß überführt. Dieses wurde mit 20-30 ml PBS 1 % FBS aufgefüllt und anschließend bei 350 rcf und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden je nach weiterer Verwendung in 1-3 ml 1xPBS 1 % FBS resuspendiert, in

ein FACS-Gefäß überführt und ein 20 µl Aliquot zur Zellzahlbestimmung entnommen. Die Zellsuspension wurde bis zur weiteren Verwendung kühl gelagert.

2.7.2 Leukozytenisolation aus Lebergewebe

Zur Isolation von Leukozyten aus Lebergewebe, war zunächst bei der Präparation darauf zu achten, dass die Leber mit PBS perfundiert wurde, um die zellulären Bestandteile des Blutes aus dem Gewebe zu entfernen. Dafür wurde mit einer 26 G Kanüle die Pfortader punktiert und ca. 7 ml PBS über diese injiziert. Zeitgleich wurde mit einem horizontalen Schnitt die Vena cava inferior unterhalb der Leber durchtrennt. Nach der Perfusion der Leber wurde die Gallenblase entfernt, die Leber vollständig entnommen und entsprechende Gewebeproben für die histologische- und RNA-Analysen aserviert.

Um zu einem späteren Zeitpunkt die Anzahl der Leukozyten auf die Gewebemenge zu normalisieren, wurde das für die zelluläre Analyse verwendete Lebergewebe gewogen und bis zur weiteren Verwendung in ein mit 10 ml 1xPBS 1 % FBS gefülltes 50 ml Reagiergefäß überführt. Als nächstes wurde das Lebergewebe in ein 150 µm Metallsieb gegeben, mit einem Stößel zerkleinert und die zellulären Bestandteile mit ausreichend 1xPBS 1 % FBS durch das Metallsieb geschwemmt. Die Zellsuspension wurde in einer Petrischale aufgefangen, in ein 50 ml Reagiergefäß überführt und bei 400 rcf und 4° C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 4 ml 40 % Percoll resuspendiert. Die Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation der leberständigen Leukozyten erfolgte wie bereits unter 2.7.1 für die Zellisolation aus Kolongewebe beschrieben.

Nach erfolgter Zentrifugation wurden die Leukozyten aus der Interphase mit Hilfe einer 1000 µl Pipette gewonnen und in ein 50 ml Reagiergefäß überführt. Das Gefäß wurde mit 25 ml 1xPBS 1 % FBS aufgefüllt und bei 350 rcf und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 2-3 ml 1xPBS 1 % FBS resuspendiert und in FACS-Gefäße transferiert. Zur Zellzahlbestimmung wurde ein 20 µl Aliquot der Zellsuspension entnommen.

2.7.3 Leukozytenisolation aus Milz- und Lymphknotengewebe

Nach der Organentnahme wurde das lymphatische Gewebe mit Hilfe eines Stößels, durch ein 100 µm messendes Zellsieb gedrückt. Dabei wurde mit ausreichend 1xPBS 1 % FBS gespült, die Zellsuspension in einem 50 ml Reagiergefäß aufgefangen und anschließend 5 Minuten bei 4° C und 350 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen, die aus der Milz isoliert wurden, zur Erythrozytenlyse in 1 ml 1xACK-Puffer resuspendiert. Nach einer

Inkubationszeit von 3 Minuten konnte das Reagiergefäß mit 50 ml 1xPBS 1 % FBS aufgefüllt und erneut bei 4°C und 350 rcf für 5 Minuten zentrifugiert werden. Abschließend wurde der Überstand verworfen und sowohl die Zellen der Milz, als auch die der Lymphknoten in 1-3 ml 1xPBS 1 % FCS resuspendiert und ein Aliquot zur Zellzahlbestimmung entnommen.

2.8 Durchflusszytometrie

2.8.1 Lebendfärbung isolierter Zellen

Zur Lebendfärbung wurde Pacific Orange NHS verwendet. Um Reaktionen des Farbstoffs mit Rückständen des FBS zu vermeiden, mussten die Zellen zunächst zweimalig mit 1xPBS gewaschen und jeweils 5 Minuten bei 350 rcf zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 200 µl einer Lösung von 1:1000 Pacific Organe in PBS resuspendiert und für 20 Minuten bei 4° C lichtgeschützt inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zweimal mit jeweils 1 ml 1xPBS gewaschen und schließlich der Oberflächenfärbung zugeführt.

2.8.2 Oberflächenfärbung

Bevor die wie unter 2.7 isolierten Zellen gefärbt werden konnten, wurden diese bei 4°C und 350 rcf für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um unspezifische Antikörperbindungen an Zellen zu vermeiden, wurden zunächst die FC-γ-Rezeptoren mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers blockiert [75]. Dafür wurden die Zellen in 50 µl FACS-Puffer, welcher 0,01 µg/µl FC-Block enthielt, resuspendiert und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend konnte dem Gemisch jeweils 50 µl des zuvor angesetzten Färbemastermix hinzugefügt werden. Die eingesetzten Antikörperverdünnungen und Konzentrationen sind der Chemikalienliste zu entnehmen. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei 4°C gefärbt, mit 1ml 1xPBS 1 % FBS versetzt und 5 Minuten bei 4°C und 350 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen je nach Zellmenge in 200-300 µl FACS-Puffer resuspendiert.

2.8.3 Restimulation und intrazelluläre Färbung

Zellen, die intrazellulär gefärbt werden sollten, mussten zunächst re-stimuliert werden. Dieser Schritt diente dazu, die Zytokinproduktion zunächst zu verstärken, um anschließend ein detektierbares Signal in der Durchflusszytometrie zu generieren. Für die Restimulation wurden die unter 2.7 isolierten Zellen zunächst bei 350 rcf und 4°C zentrifugiert und anschließend in 1 ml Restimulationsmedium resuspendiert. Das Restimulationsmedium setzte sich aus DMEM-Vollmedium, 1 % Penicillin und Streptomycin, 10 % FBS, PMA, Ionomycin und Monensin zusammen. Die Zellen wurden für 3-4 Stunden bei 37° C und 5% CO₂ restimuliert.

Nach Ablauf der Restimulationszeit wurden die Zellen bei 350 rcf und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Als nächstes folgte die Oberflächenfärbung (siehe

2.8.1). Nach erfolgter extrazellulärer Färbung wurden die Zellen zunächst bei 4° C und 350 rcf für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend in 100 µl Fixier-Puffer (3,6% Formaldehyd in FACS-Puffer) resuspendiert. Es folgte eine lichtgeschützte Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 1 ml 1xPBS 1 % FBS zu den Zellen gegeben und die Suspension anschließend 5 Minuten bei 350 rcf und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 100 µl Permeabilisierungspuffer (0,1% NP40 in FACS-Puffer) resuspendiert und 4 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die Zellsuspension wurde mit 1 ml 1xPBS 1 % FBS aufgefüllt und erneut 5 Minuten bei 4° C und 350 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen im Färbemastermix für die intrazelluläre Färbung resuspendiert und für mindestens 12 Stunden bei 4° C lichtgeschützt inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS 1 % FBS gewaschen und jeweils bei 4° C und 350 rcf für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen je nach Zellmenge in 200-300µl FACS-Puffer resuspendiert.

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie erfolgte am LSR Fortessa. Die Daten wurden mit Hilfe der Flowjo-Software (Version 8.8.6) und Microsoft-Excel analysiert und in Prism 5 graphisch dargestellt.

2.9 *In vitro* Zelldifferenzierung

2.9.1 Isolation naiver CD4⁺-Zellen mittels MACS

Für die Isolation von naiven CD4⁺-T-Helferzellen sowie von antigenpräsentierenden Zellen (APC) wurde die MACS Microbead Technologie verwendet [76]. Diese macht sich zu nutzte, dass in unterschiedlichen Schritten Oberflächenantigene mit Antikörpern, die an magnetische Microbeads gekoppelt sind, zunächst gebunden werden und schließlich in einem Magneten von anderen Zellen getrennt werden können.

Für die Zellisolation wurden zunächst aus den entsprechenden Donortieren die benötigten sekundären lymphatischen Organe entnommen (Milz, inguinale, axilläre und zervikale Lymphknoten) entnommen und bis zum weiteren Gebrauch in 1xPBS 1 % FBS auf bei 4° C gelagert. Die folgenden Schritte erfolgten unter sterilen Zellkulturbedingungen. Zunächst wurden die Organe durch ein 100 µm Zellsieb mit Hilfe eines Stößels gedrückt und mit 1xPBS 1 % FBS gespült. Die Zellsuspension wurde in einem 50 ml Reagiergefäß aufgefangen und anschließend für 5 Minuten bei 350 rcf und 4° C zentrifugiert.

Im ersten Schritt sollten zunächst die Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD44⁺) und aktivierte T-, B- und myeloische Zellen sowie regulatorische T-Zellen (alle CD25⁺) aus der Zellsuspension entfernt werden. Aus diesem Grund wurde nach Verwerfen des Überstandes das Zellpellet in 1 ml MACS-Puffer mit 1:400 Anti-CD25-Biotin (0,075 µg) und 1:200 Anti-CD44-Biotin (0,15 µg) resuspendiert, in ein 15 ml Reagiergefäß überführt und für 15 Minuten bei 4° C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Gefäß mit MACS-Puffer aufgefüllt, für 5 Minuten bei 4° C und 350 rcf zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml MACS-Puffer mit 40 µl Streptavidin-Microbeads resuspendiert. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4° C. Auf diese Weise konnte das an die magnetischen Beads gebundene Streptavidin an das Biotin binden. In der Zwischenzeit wurden die Separiersäulen in den Magneten gestellt und einmal mit MACS-Puffer befeuchtet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension durch ein 50 µm Zellsieb auf die Säulen gegeben und die Säulen anschließend dreimal mit jeweils 4 ml MACS-Puffer gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 4° C und 350 rcf. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml 1:10 mit MACS-Puffer verdünnten Anti-CD4-Microbeads resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C wurden die Zellen auf eine neue, bereits zuvor befeuchtete Säule im Magneten gegeben und dreimalig mit 4 ml MACS-Puffer gewaschen. Die isolierte CD4⁺ Zellfraktion wurde in ein neues 15 ml Reagiergefäß aufgefangen und bis zum weitem Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Die Säule wurde aus dem Magneten entnommen, 4 ml MACS-Puffer hinzugefügt und mit einem Stempel vorsichtig Druck auf die Säule ausgeübt. Auf diese Weise konnte die CD4⁺ Zellfraktion von der Säule gelöst und in einem neuen 15 ml Reagiergefäß aufgefangen werden. Diese so isolierten Zellen wurden bis zum weiteren Gebrauch bei 4° C gelagert.

Zur Isolation von APCs wurde die CD4⁺ Zellfraktion zentrifugiert, das Zellpellet in 1 ml 1:200 mit MACS-Puffer verdünnten Anti-CD3-Biotin-Antikörper resuspendiert und für 15 Minuten bei 4° C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Reagiergefäß mit MACS-Puffer aufgefüllt und 5 Minuten bei 4° C und 350 rcf zentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml MACS-Puffer, der mit 40 µl Streptavidin Microbeads versehen war, resuspendiert und 30 Minuten bei 4° C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung mittels einer im Magneten befindlichen Säule die dreimalig mit jeweils 4 ml MACS-Puffer gewaschen wurde. Bei den so isolierten Zellen handelte es sich um APCs. Diese wurden für den weiteren Gebrauch zunächst zentrifugiert, in 5 ml Vollmedium (DMEM 10 % FBS 1 % Penicillin und Streptomycin) resuspendiert und anschließend mit 30 Gy bestrahlt. Von den APCs und den naiven CD4⁺ T-Helferzellen wurde jeweils ein Aliquot zur Zellzahlbestimmung entnommen.

2.9.2 Th1/Th17/Th0 Polarisierende Zellkulturbedingungen

Um die wie unter 2.9.1 beschrieben, isolierten naive CD4⁺ T-Helferzellen *in vitro* zu den unterschiedlichen T-Helferzellsubklassen (Th0, Th1, Th17) zu differenzieren, wurden die Zellen bei unterschiedlich polarisierenden Zellkulturbedingungen kultiviert. Für alle Kulturbedingungen wurden zunächst die bereits bestrahlten APCs und naive CD4⁺ T-Helferzellen im Verhältnis 4-2:1 vermischt und anschließend die Zellkonzentration auf 1*10⁶ Zellen/ml mit dem Kulturmedium (IMDM-Medium mit 10 % FBS, 1 % Penicillin und Streptomycin, 1 % Glutamin und 100 nmol/l β-Mercaptoethanol) eingestellt. Als Nächstes wurden die Zellen zu gleichen Teilen aufgeteilt und die Medien mit den in der Tabelle aufgeführten Zytokinen und Antikörpern versehen.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Zellkulturbedingungen bei der *in vitro* Differenzierung von T_H0, T_H1 und T_H17-Zellen

Zytokine/ Antikörper	Stockkonzentraion	T _H 1	T _H 17	T _H 0
Anti CD3	1 mg/ml	3 µg/ml	3 µg/ml	3 µg/ml
Anti CD28	0,5 mg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1µg/ml
TGF-β	1 µg/ml	/	0,5 ng/ml	/
IL-6	10 µg/ml	/	10 ng/ml	/
IL-23	20µg/ml	/	20 ng/ml	/
IL-1β	10 µg/ml	/	10 ng/ml	/
Anti-IFNγ	1 mg/ml	/	10 µg/ml	10 µg/ml
Anti-IL-4	1 mg/ml	10 µg/ml	10µg/ml	10 µg/ml
IL-12	10 µg/ml	10 ng/ml	/	/
IL-2	10 µg/ml (50 U/µl)	100 U/ml	/	/

Jeweils 200 µl der Zellsuspension wurde mit einer Mehrkanalpipette in die Kavitäten einer 96-Kavitäten-Rundboden-Platte pipettiert und für 5 Tage bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen aus den Kavitäten der Zellkulturplatte in ein 50 ml Reagiergefäß überführt, für 5 Minuten bei 4° C und 350 rcf zentrifugiert und anschließend eine Oberflächenfärbung für T-zellspezifische Antigene durchgeführt (CD4 und CD3). Die Färbung erfolgte wie bereits unter 2.8.2 beschrieben. Die auf diese Weise differenzierten Zellen konnten anschließend auf Grund ihrer Oberflächenfärbung in Kombination mit ihrer Fluoreszenz für die entsprechenden Reportergene mittels Aria Sorter sortiert werden. Auf diese Weise war es möglich, die unterschiedlichen *in vitro* differenzierten T-Helferzellen-subklassen zu trennen und eine möglichst reine Zellpopulation zu erhalten.

Nach der Zellsortierung wurden diese zunächst für 5 Minuten bei 4° C und 350 rcf zentrifugiert, in 5 ml 1xPBS resuspendiert und ein Aliquot für die Zellzahlbestimmung entnommen. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 4°C und 350 rcf für 5 Minuten. Die Zellen wurden schließlich auf eine Konzentration von 0,5-1 *10⁶ Zellen/ml eingestellt und jeweils 200 µl pro Maus intraperitoneal injiziert.

2.10 Genexpressionsanalysen aus Gewebe

2.10.1 RNA-Aufreinigung aus Gewebe

Zur Isolation von RNA aus Gewebe wurde eine Trizol basierte Methode verwendet [77]. Dabei wurde die RNA mit Hilfe eines Gemisches aus Trizol (Phenol und Guanidiniumisothiocyanat) und Chloroform zunächst gelöst, DNA und Proteine durch Zentrifugation von der RNA getrennt und diese schließlich mittels Isopropanol ausgefällt.

Die Gewebeproben wurden zunächst in ein RNase-freies 1,5 ml Reagiergefäß überführt, mit 1 ml Trizol versetzt und das Gewebe anschließend mit einem Stößel so weit zerkleinert, dass keine zusammenhängenden Gewebestücke mit dem bloßen Auge zu erkennen waren. Anschließend wurden 200 µl Chloroform dem Gemisch hinzugefügt, die Proben für 30 Sekunden gut gemischt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 4° C und 13500 rcf. Anschließend wurden 500 µl des Überstands in ein 500 µl Isopropanol enthaltene Reagiergefäß überführt, durch Schütteln gut durchmischt und die RNA für 18-20 Stunden bei -20° C ausgefällt. Nach dem präzipitieren der RNA erfolgte ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 4° C und 13500 rcf. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das mit dem bloßen Auge sichtbare RNA-Pellet mit 700 µl 70 %igem Ethanol umspült. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 4° C und 13500 rcf. Der ethanolhaltige Überstand wurde verworfen und die RNA für ca. eine Stunde mit geöffnetem Deckel getrocknet. Sobald das RNA-Pellet durchsichtig war, wurde dieses in 30-150 µl RNase freiem Wasser gelöst und für 5 Minuten bei 55° C und 300 rcf im Thermomixer inkubiert. Nach erfolgreichem Lösen der RNA wurde diese unverzüglich bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt oder bei späterer Verwendung bei -80° C gelagert.

2.10.2 mRNA-Isolation bei DSS-kontaminierten Proben

Wie bereits durch Kerr *et al.* [78] beschrieben, hemmt das für die Induktion einer Kolitis verwendete DSS sowohl die Reversetranskriptase bei der cDNA-Synthese als auch die TaqPolymerase bei der Real-Time-PCR. Um dennoch verlässliche Genexpressionsanalysen aus DSS kontaminierten Gewebeproben durchführen zu können, wurden die RNA-Proben nach der unter 2.10.2 beschriebenen Isolation einer Poly-A-Schwanz Aufreinigung unterzogen.

Zur Isolation der mRNA wurde das Dynabeads® mRNA DIRECT™ Purification Kit von Thermofisher Scientific verwendet. Die RNA-Aufreinigung erfolgte wie vom Hersteller empfohlen.

2.10.3 cDNA-Synthese und Real-Time-PCR

Zur Synthese der cDNA wurde das High capacity cDNA RT-Kit von Applied Biosystems verwendet. Bei nicht DSS-kontaminierten RNA-Proben wurden zunächst die RNA-Konzentration und Reinheit mittels Nanodrop ermittelt und jeweils 2 µg RNA für die cDNA-Synthese verwendet. Somit setzte sich ein 20 µl cDNA-Synthese Ansatz wie folgt zusammen: 2 µl 10xRT-Puffer, 0,8 µl dNTP Mix (100 mM), 2 µl 10xRandom Primers, 1 µl MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µL), 0,25 µl RNase Inhibitor RiboLock (40 U/µl). RNase-freies Wasser wurde, abhängig von der RNA-Konzentration, bis zu einem Endvolumen von 20 µl hinzugefügt.

Bei RNA-Proben, die zuvor eine RNA-Aufreinigung, wie unter 2.10.2 beschrieben, erfahren hatten, erfolgte die cDNA-Synthese in einem doppelten Ansatz (40 µl). Von der RNA wurden konzentrationsunabhängig jeweils 27,9 µl eingesetzt.

Zur Durchführung der Genexpressionsanalyse mittels Real-Time-PCR wurde die zuvor synthetisierte cDNA zunächst im Verhältnis 1:3 mit Wasser verdünnt. Die Reaktionsansätze hatten jeweils ein Volumen von 5 µl und wurden in Duplikaten auf den PCR-Platten pipettiert. Für einen PCR-Ansatz wurden 2,5 µl Taq Man Fast Advanced Master Mix, 0,25 µl TaqMan Primer Probe, sowie 1,25 µl Wasser zusammen pipettiert und in die Kavität einer 96-Kavitäten-Reaktionsplatte vorgelegt. Anschließend wurde jeweils 1 µl der verdünnten cDNA den Reaktionsansätzen hinzugefügt. Um das Verdunsten der Reaktionsansätze und eine Kreuzkontamination zu vermeiden, wurden anschließend die Platten mit einem optischen Adhäsionsfilm verschlossen. Um eventuell an den Wänden der Platte klebende Ansatzreste in die Kavitäten der Platte zu befördern, wurde diese für eine Minute bei Raumtemperatur und 350 rcf zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Platte in den StepOnePlus™ Real-Time PCR-Cycler der Firma Applied Biosystems eingelegt und die PCR mit dem in Tabelle 10 dargestellten Programm durchgeführt.

Tabelle 12: RT-PCR Programm. Die Schritte 3 und 4 wurden jeweils 40 Mal durchgeführt

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
1	50	02:00
2	95	00:20
3	95	00:01
4	60	00:20

Die Auswertung der Daten erfolgte nach der vergleichenden C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$) in Microsoft Excel.

2.11 Histopathologie von Gewebeproben

Für die feingewebliche Analyse wurden die Gewebeproben von Leber und Kolon unmittelbar nach der Entnahme in entsprechend beschriftete Einbettkassetten gelegt und diese in ein Bad mit 4 %-ige phosphatgepufferte Formaldehydlösung (PFA) überführt. Die Proben wurden mindestens 24 Stunden und maximal 7 Tage im PFA-Bad gelagert. Das Entwässern sowie das Einbetten der Gewebeproben erfolgte am Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf.

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcke wurden mit einem Mikrotom in 4 µm dicke Schnitte geschnitten, auf eine Glasobjektträger überführt und für eine Nacht auf einer Wärmeplatte getrocknet. Die Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE) erfolgte am Institut für Pathologie.

Bei Leberproben wurde der mHAI-Score [79, 80] für die Leberentzündung verwendet und die Fibrose wie bei Kamal *et al.* [80] beschrieben evaluiert. Dickdarmentzündungen wurden mit der von Hartmann *et al.* [81] veröffentlichten Beurteilungsmethode untersucht. Die Proben wurden verblindet von einem Pathologen beurteilt.

2.12 Blutentnahmen und Blutanalysen

Für die Analyse der Lebertransaminasen aus peripher venösem Blut wurde den Mäusen unter Isoflurannarkose zunächst retrobulär Blut mit einer 100 µl Glaskapillare entnommen und dieses in ein 1,5 ml Reagiergefäß, das 2 µl 0,5 M EDTA enthielt, überführt. Dabei war darauf zu achten, dass das Blut und EDTA gut durchmischt waren. 20 Minuten nach der Entnahme wurden die Blutproben bei 850 rcf und 4° C für 10 Minuten zentrifugiert, 30 µl des so gewonnenen Plasmas in ein 120 µl 1xPBS enthaltende Reagiergefäß transferiert und das Gemisch anschließend in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bis zum Zeitpunkt der Analyse bei -20° C archiviert.

Die Analyse der Plasmaproben erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin. Es wurden die Blutwerte für Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) bestimmt.

2.13 Statistische Auswertung

Alle aufgeführten Werte sind als Mittelwert mit dem dazugehörigen Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Das Signifikanzniveau p wurde auf 5 % ($p = 0,05$) 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 eine zweiseitige ANOVA (Analysis of variance) durchgeführt. Bei signifikanter Interaktion schloss sich jeweils ein Wilcoxon-Mann-Whitney-Test der einzelnen Behandlungsgruppen gegen die Kontrollgruppe an, das Signifikanzniveau wurde ebenfalls nach Bonferoni angepasst. Zur Auswertung, graphischen Darstellung sowie zur Signifikanztestung wurde die Software GraphPadPrism 5.0 verwendet

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss einer Kolitis auf die Entstehung einer Leberpathologie

Um den Einfluss einer Kolitis auf die PSC beurteilen zu können, wurde zunächst untersucht, ob eine Kolitis per se eine Leberpathologie in Mäusen hervorrufen kann. Aus diesem Grund wurde mittels unterschiedlicher Kolitis-Modelle eine Dickdarmentzündung induziert und anschließend nach Anzeichen einer Entzündung in der Leber gesucht.

3.1.1 Akute und chronische DSS-Kolitis bei Wildtyp Mäusen

Die DSS-Kolitis ist ein etabliertes und weit verbreitetes Mausmodell zur Induktion einer Entzündung im Bereich des Dickdarms und somit zur Studie von Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen. Durch die wiederholte Gabe des DSS ist es möglich, den chronischen Verlauf insbesondere der Colitis ulcerosa zu simulieren.

Im Rahmen der akuten DSS-Kolitis erhielten die Wildtyp Mäuse über einen Zeitraum von sieben Tagen 2,5 % DSS im autoklavierten Leitungswasser *ad libitum*. Um die Phasen der höchsten Entzündungsaktivität sowie der Regeneration zu erfassen, wurde für die akute DSS-Kolitis ein zeitlicher Verlauf erstellt. Dafür wurden an den Versuchstagen 0, 5, 7, 9, 11 und 13 jeweils fünf Tiere analysiert.

Die chronische DSS-Kolitis setzte sich aus drei Behandlungszyklen mit 2,5 % DSS in autoklavierten Leitungswasser *ad libitum* zusammen, wobei die ersten beiden Zyklen jeweils fünf Tage und der letzte Zyklus sieben dauerte. Während der 16-tägigen Erholungsphase zwischen den einzelnen Zyklen erhielten die Tiere autoklaviertes Leitungswasser. Sowohl bei der akuten als auch der chronischen DSS-Kolitis erfolgte die Organentnahme zur histopathologischen und zellulären Analyse zwei Tage nach Absetzen des DSS.

Wie aus der Abbildung 1a-c hervorgeht, kam es innerhalb kurzer Zeit nach Induktion einer akuten DSS-Kolitis bei den behandelten Tieren zu einem Gewichtsverlust sowie zu einem Anstieg des endoskopischen Kolitis-Score und einer Verkürzung des Kolons. Der Höhepunkt der Erkrankung wurde etwa zwei bis vier Tage nach Absetzen des DSS, also zwischen den Tagen 9 bis 11, erreicht. Die durchflusszytometrische Analyse der Leukozyten im Kolongewebe ergab ebenfalls eine im Zeitverlauf steigende Zellzahl, was als Zeichen der Entzündung zu deuten ist (Abbildung 1d). Die histopathologische Auswertung HE-gefärbter Gewebeschnitte der Leber zeigte bezüglich der Entzündungsaktivität einen leichten Anstieg nach der Kolitisinduktion (Abbildung 1e+g). Bei dem mikroskopisch erhobenen Grad der Fibrose konnten keine Unterschiede zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe

festgestellt werden (Abbildung 1f+g). Dieses Ergebnis war im Einklang mit der Analyse der pro-fibrotischen Gene *Cola1a1*, *Acta2* und *Timp1* aus dem Lebergewebe (Abbildung 1h), bei denen es ebenfalls zu keiner Beeinflussung durch die Kolitis kam.

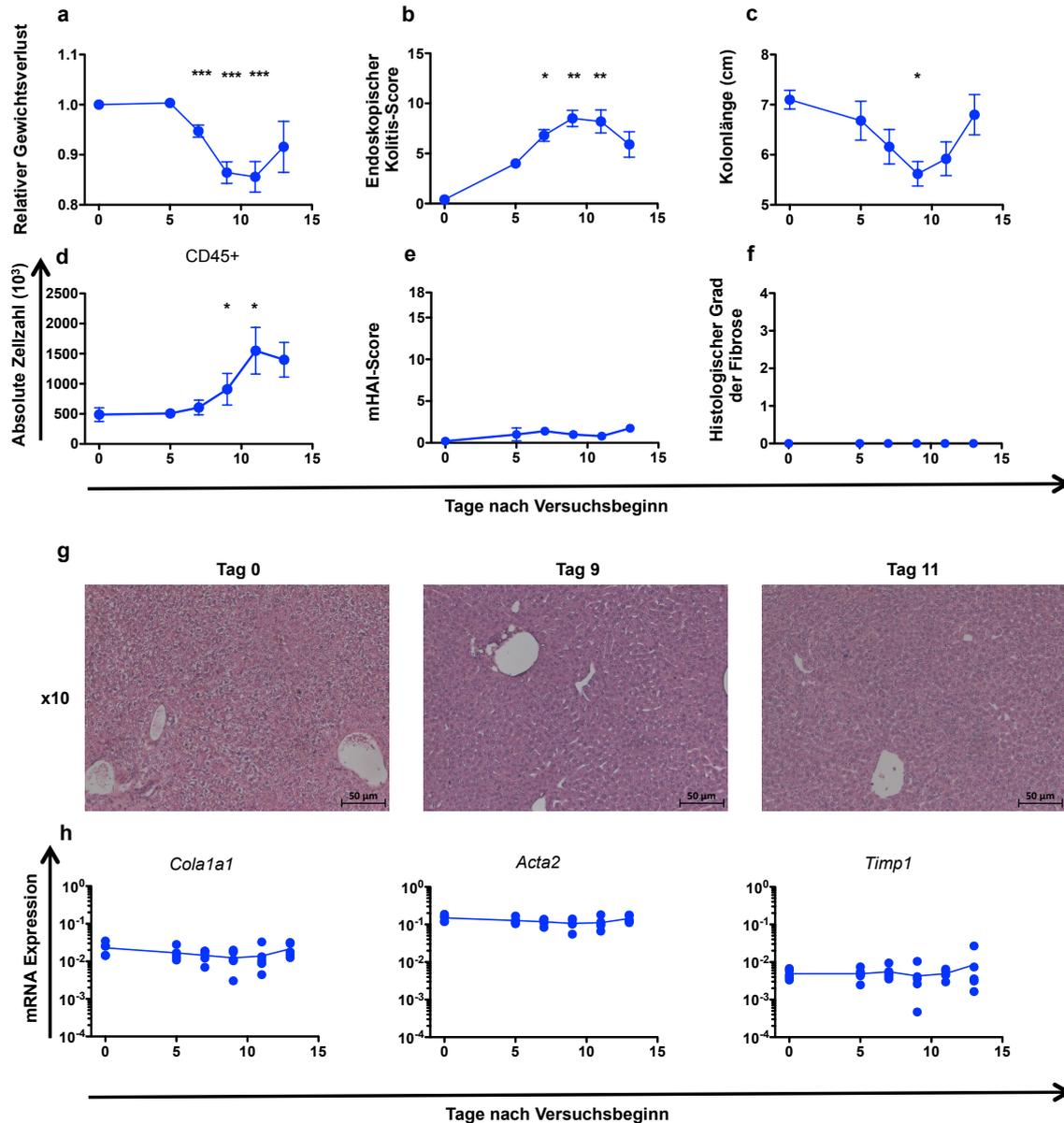


Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der klinischen Verlaufparameter einer akuten DSS-Kolitis in Wildtyp Mäusen. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM von jeweils fünf Tieren pro Versuchstag. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. Die Signifikanzen (*) beziehen sich jeweils auf die Kontrollen zum Zeitpunkt 0. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. a) relativer Gewichtsverlust bezogen auf das initiale Gewicht; b) Endoskopischer Kolitis-Score; c) Kolonlänge; d) Absolute Zellzahl der aus Kolongewebe isolierten Leukozyten e) histopathologische Beurteilung der Entzündungsaktivität an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; f) histopathologische Beurteilung der Leberfibrose an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; g) repräsentative, HE-gefärbte histologische Bilder der Leber von Tag 0, 9 und 11 in 10-facher Vergrößerung; h) Expressionsanalyse pro-fibrotischer Gene *Cola1a1*, *Acta2* und *Timp1* aus Lebergewebe.

Betrachtet man die zelluläre Analyse der Leber in Abbildung 2, so fällt auf, dass im Verlauf der Darmentzündung die Zahl der CD45⁺ Zellen, also der hämatopoetischen Zellen, leicht anstieg. Während die Frequenzen der CD4⁺ T-Zellen bis zu den Tagen 9 und 11 signifikant abfielen, waren die absoluten Zellzahlen für diese Zellpopulation nicht signifikant verändert (Abbildung 2b). Der Abfall der Frequenzen der CD4⁺ T-Zellen kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass neben den T-Zellen auch andere hämatopoetische Zellen in der Leber akkumulierten. Bei der weiteren Charakterisierung der T-Zellen konnte eine signifikante Erhöhung der Frequenzen und absoluten Zellzahlen der IFN γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen am elften Tag festgestellt werden. Auch bei der Zellpopulation, die nur IL-17A produzierte, konnte ein Maximum der Infiltration am elften Tag der Kolitis beobachtet werden. Die gleiche Beobachtung galt für die Zellpopulation, die sowohl IFN γ als auch IL-17A produzierte. Bei der Analyse der CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen, die die Leber während der akuten DSS-Kolitis infiltrierten, konnte ein signifikanter Anstieg für die Frequenz an den Tagen 9 und 13 festgestellt werden.

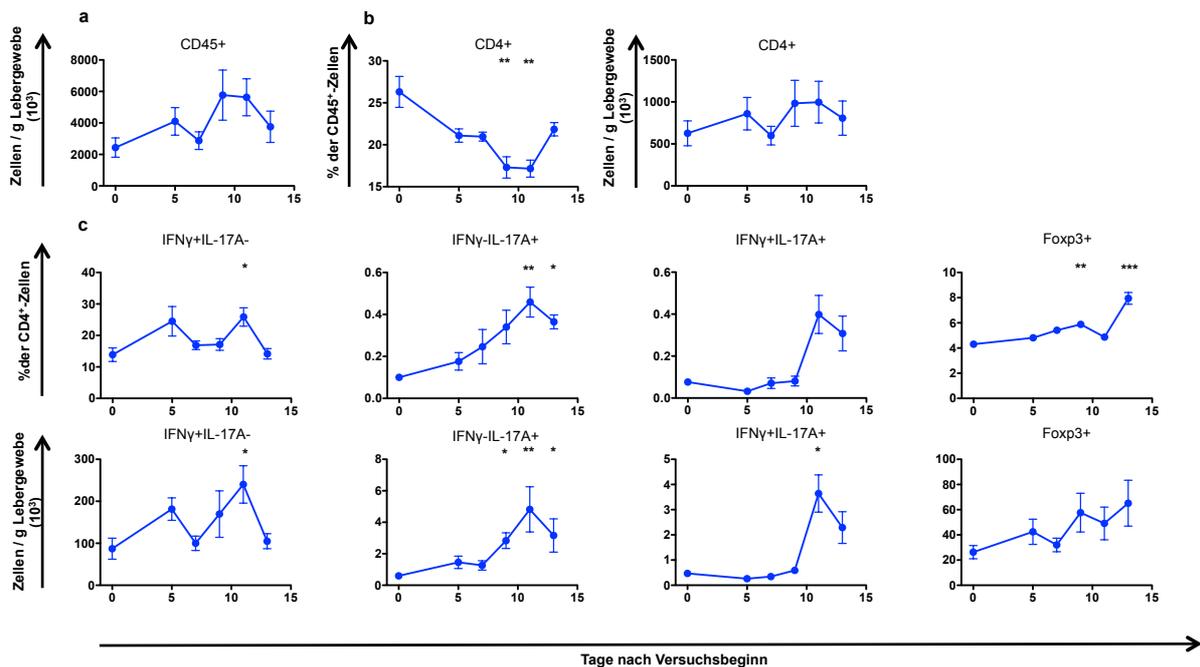


Abbildung 2: Analyse der unterschiedlichen CD4⁺ T-Zellen in der Leber im Verlauf einer akuten DSS-Kolitis bei Wildtyp Mäusen. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM von jeweils fünf Tieren pro Versuchstag. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. Die Signifikanzen (*) beziehen sich jeweils auf die Kontrollen zum Zeitpunkt 0. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. a) Absolute Zellzahl der CD45⁺ Zellen in der Leber; b) Frequenz und absolute Zellzahl der CD4⁺ T-Zellen in der Leber; c) Frequenz und absolute Zellzahl der IFN γ ⁺, IL-17A⁺, IL-17A⁺ und IFN γ ⁺ doppelt positiven sowie Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen in der Leber.

Die beschriebenen Zellpopulationen werden in der Literatur auf Grundlage der von ihnen hauptsächlich produzierten Zytokine als T_H1 ($IFN\gamma^+$), T_H17 ($IL-17A^+$) oder T_H1+T_H17 ($IFN\gamma^+$, $IL-17A^+$) Zellen bezeichnet. Diese Zellen gelten in der Regel als entzündungsfördernde Zellpopulationen. Eher anti-inflammatorisch wirksame Zellen, wie regulatorische T-Zellen (T_{reg}), sind dagegen durch die Expression des Haupttranskriptionsfaktors *Foxp3* definiert.

Neben Zellen des adaptiven Immunsystems konnte auch ein vermehrter Einstrom von Zellen des angeborenen Immunsystems in die Leber nachgewiesen werden (Abbildung 3). Bei diesen Zellen handelte es sich überwiegend um $Ly6C^+$, also monozytäre und $Ly6G^+$, also granulozytäre Zellen. Bei den Zellen des angeborenen Immunsystems fiel der Zeitpunkt der maximalen Zellinfiltration in die Leber auf den Zeitraum zwischen den neunten und elften Versuchstag. Dabei waren sowohl die Frequenzen als auch die absoluten Zellzahlen für diese Zellpopulationen erhöht.

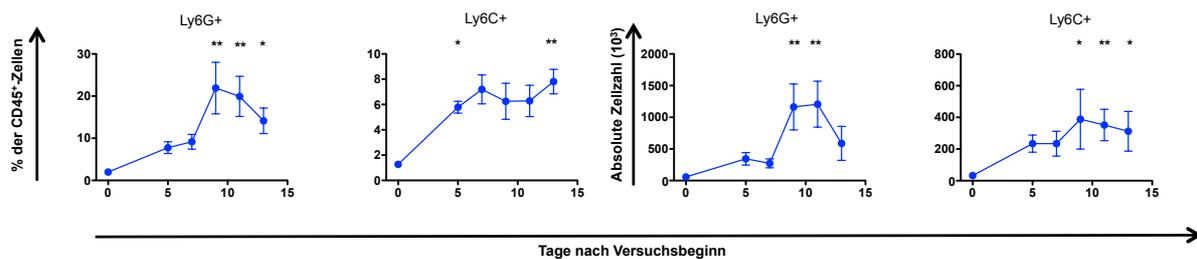


Abbildung 3: Verlauf der Frequenz und absolute Zellzahl der granulozytären und monozytären Zellen in die Leber während einer akuten DSS-Kolitis in Wildtyp Mäusen. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM von jeweils fünf Tieren pro Versuchstag. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. Die Signifikanzen (*) beziehen sich jeweils auf die Kontrollen zum Zeitpunkt 0. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$.

Passend zu der frühen Aktivierung der Zellen des angeborenen Immunsystems während einer akuten DSS-Kolitis, konnte im Lebergewebe eine frühzeitig erhöhte Expression der pro-inflammatorischen Zytokine *Il6* und *Tnfa* festgestellt werden (Abbildung 4a). Dabei konnte die höchste Expression für *Il6* an den Tagen 5 und 7 und für *Tnfa* an den Tagen 7, 11 und 13 nach Induktion der Kolitis gemessen werden.

Die Expression des Chemokins *Cxcl11*, welches für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten verantwortlich ist, war dagegen erst an den Tagen 9 und 11 signifikant erhöht. *Ccl25*, ein Chemokin welches für die Rekrutierung von T-Zellen aus dem Darm verantwortlich ist, zeigte sich in der Expressionsanalyse in der Leber zu keinem Zeitpunkt erhöht. (Abbildung 4b)

Die Expressionsanalyse für *Il17a* in der Leber zeigte, dass auch dieses Zytokin während einer akuten DSS-Kolitis verstärkt exprimiert wurde. Dabei lag das Maximum der Expression am Tag 9 der Behandlung, also zwei Tage vor dem Maximum des Proteinnachweises (Abbildung 2, Abbildung 4c). Für *Ifng* konnte auf RNA-Ebene keine signifikante Änderung der Expression in der Leber bei einer akuten DSS-Kolitis festgestellt werden.

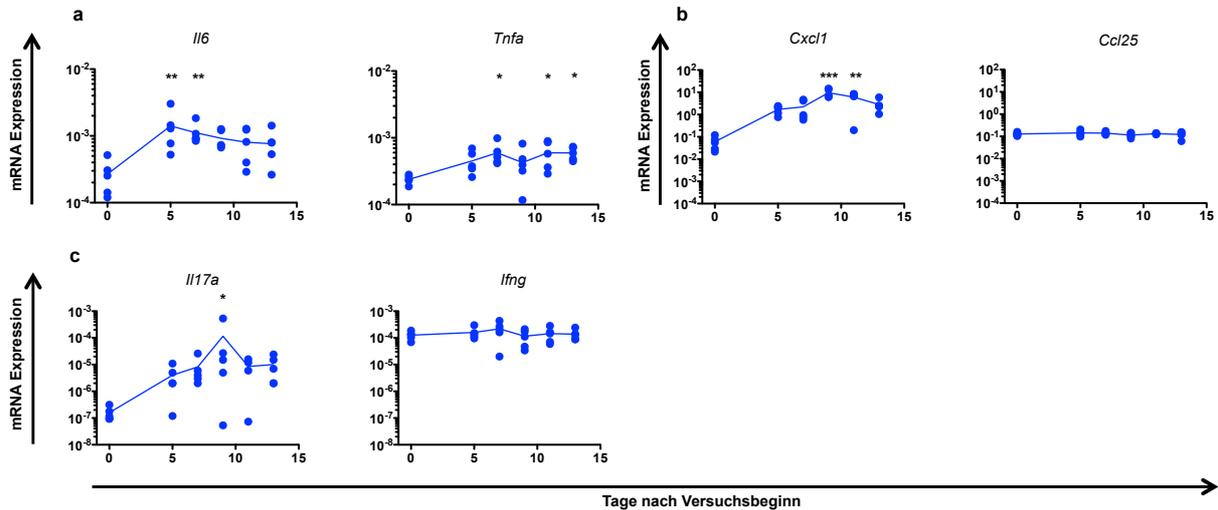


Abbildung 4: Expression pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine in der Leber im Verlauf einer akuten DSS-Kolitis in Wildtyp Mäusen. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM von jeweils fünf Tieren pro Versuchstag. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. Die Signifikanzen (*) beziehen sich jeweils auf die Kontrollen zum Zeitpunkt 0. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. a) Expression von *Il6* und *Tnfa* in der Leber; b) Expression von *Cxcl1* und *Ccl25* in der Leber; c) Expression von *Il17a* und *Ifng* in der Leber.

Da es sich bei der Colitis ulcerosa um eine chronisch, rezidivierende Dickdarmentzündung mit entzündungsfreien Remissionsphasen handelt, sollte als nächstes untersucht werden, ob eine rezidivierende Kolitis einen stärkeren Einfluss auf die Entstehung einer Leberpathologie im Mausmodell haben könnte. Wie in der Abbildung 5a-c an Hand von Gewichtsverlauf, Kolitis-Score und Kolonlänge dargestellt, konnte auch bei diesen Tieren erfolgreich eine Dickdarmentzündung induziert werden. Zudem zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl an Leukozyten im Kolongewebe DSS-behandelter Tiere (Abbildung 5d). Die Bestimmung der Lebertransaminasen aus dem venösen Blut zeigte keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen (Abbildung 5e). Leider war es bei diesem Experiment aus technischen Gründen nicht möglich eine histologische Beurteilung der Lebern in Bezug auf die Entzündungsaktivität und Fibrose durchzuführen.

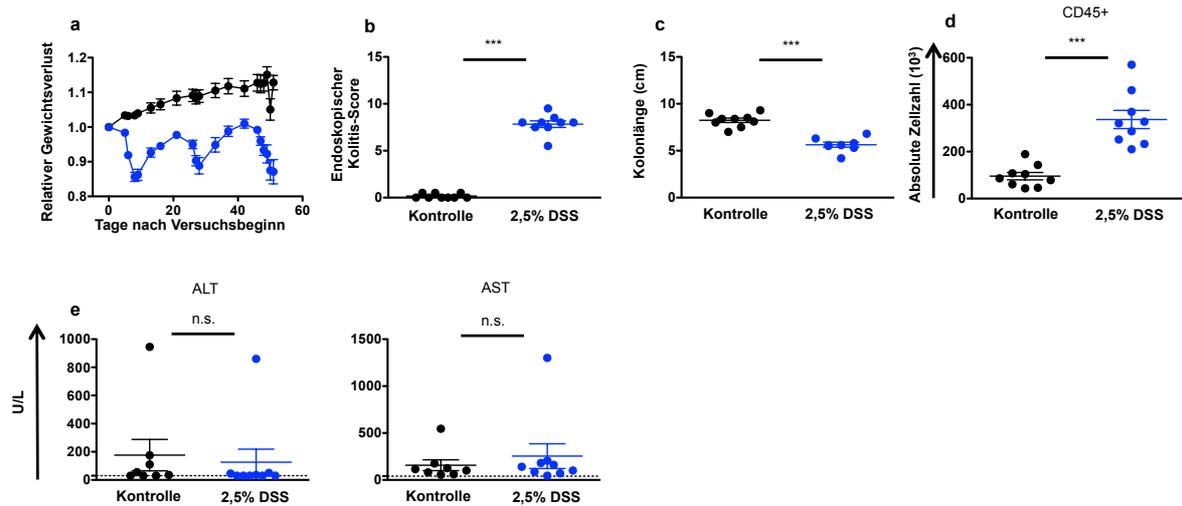


Abbildung 5: Klinische Parameter einer chronischen DSS-Kolitis in Wildtyp Mäusen. Den Tieren wurde in insgesamt drei Zyklen 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht, zwischen den Zyklen erhielten sie autoklaviertes Leitungswasser. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM von jeweils neun Tieren je Versuchsgruppe. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney T-Test. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. a) relativer Gewichtsverlust; b) Endoskopischer Kolitis score; c) Kolonlänge; d) Absolute Zellzahl der aus Kolongewebe isolierten Leukozyten; e) Lebertransaminasen aus venösem Blut.

Ebenso wie in der akuten DSS-Kolitis kam es auch bei der chronischen DSS-Kolitis zu einer Infiltration von pro-inflammatorischen Zellen in die Leber. Dabei konnte insbesondere eine erhöhte Frequenz und erhöhte absolute Zellzahl der T_{H17} , $T_{H1}+T_{H17}$ und T_{reg} Zellen zwei Tage nach Absetzen des DSS des letzten Zyklus festgestellt werden (Abbildung 6). Die T_{H1} -Zellpopulation war dagegen weder in der Frequenz noch der absoluten Zellzahl gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe signifikant verändert.

Auch bei den Zellen des angeborenen Immunsystems konnte eine erhöhte Frequenz und absolute Zellzahl für die $Ly6C^+$ - und $Ly6G^+$ -Zellen in der Leber nach einer chronischen DSS-Kolitis festgestellt werden (Abbildung 7).

Resultate

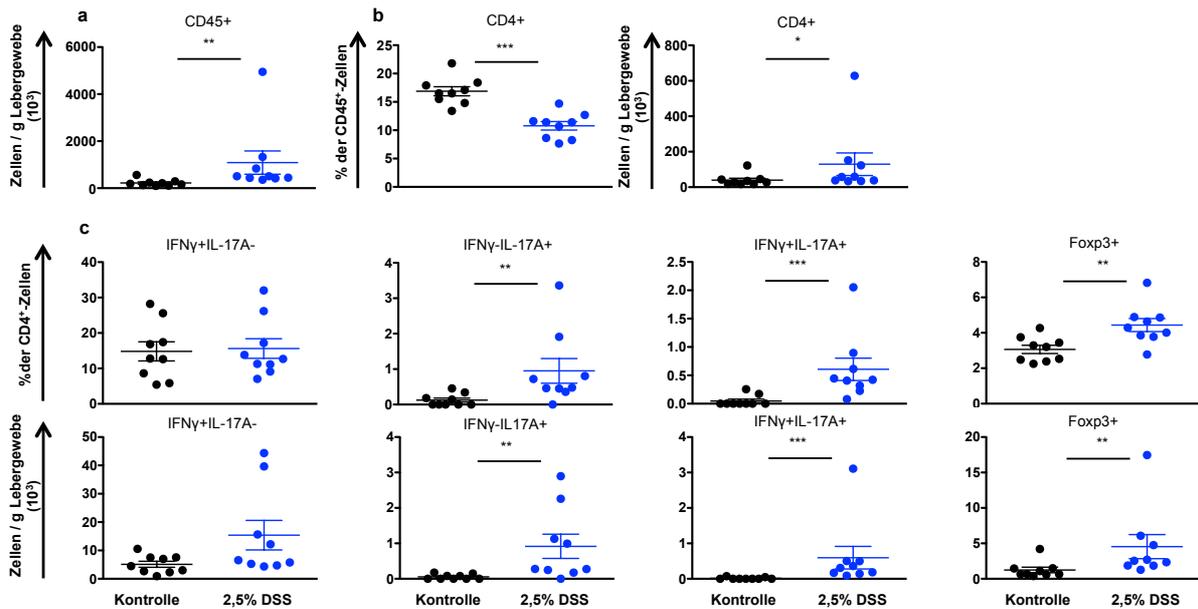


Abbildung 6: Analyse der unterschiedlichen CD4⁺ T-Zellen in der Leber am Ende einer chronischen DSS-Kolitis bei Wildtyp Mäusen. Den Tieren wurde in insgesamt drei Zyklen 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht, zwischen den Zyklen erhielten sie autoklaviertes Leitungswasser. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM von jeweils neun Tieren je Versuchsgruppe. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney T-Test. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. a) Absolute Zellzahl der CD45⁺ Zellen; b) Frequenz und absolute Zellzahl der CD4⁺ T-Zellen in der; c) Frequenz und absolute Zellzahl der IFN γ ⁺, IL-17A⁺, IL-17A⁺ und IFN γ ⁺ doppelt positiven sowie Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen.

Für die chronische DSS-Kolitis konnte eine vermehrte Expression von *Il6* und *Cxcl1* in der Leber nachgewiesen werden. Interessanterweise war in diesem Fall die Expression des *Tnfa*, *Ifng* und *Ccl25* in der Behandlungsgruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren reduziert (Abbildung 8). Die Expression von *Il17a* in der Leber lag unterhalb der Detektionsgrenze.

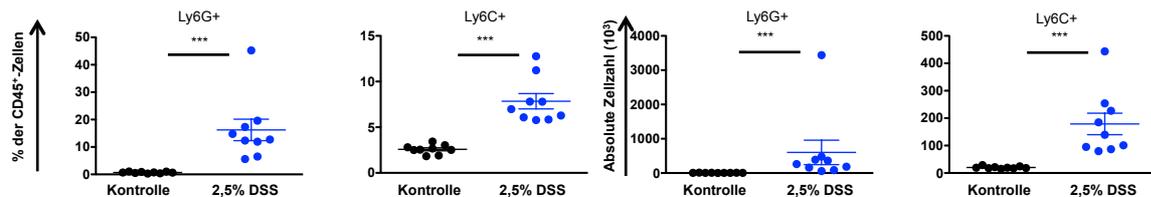


Abbildung 7: Frequenz und absolute Zellzahl der granulozytären und monozytären Zellen in die Leber am Ende einer chronischen DSS-Kolitis in Wildtyp Mäusen. Den Tieren wurde in insgesamt drei Zyklen 2,5% DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht, zwischen den Zyklen erhielten sie autoklaviertes Leitungswasser. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM von jeweils neun Tieren je Versuchsgruppe. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney T-Test. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl eine akute als auch eine chronische DSS-Kolitis zu einer Akkumulation von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, insbesondere T_H17, T_H1+T_H17 und T_{reg}, in der Leber führte, T_H1 Zellen kamen dagegen nicht vermehrt in den Lebern von DSS-behandelten Tieren vor. Im direkten Vergleich von chronischer und akuter DSS-Kolitis waren die Effekte bei der chronischen

DSS-Kolitis deutlicher ausgeprägt. Hinweise auf eine vermehrte Fibrosierung der Lebern der behandelten Tiere bestanden zumindest bei den akut behandelten Tieren nicht.

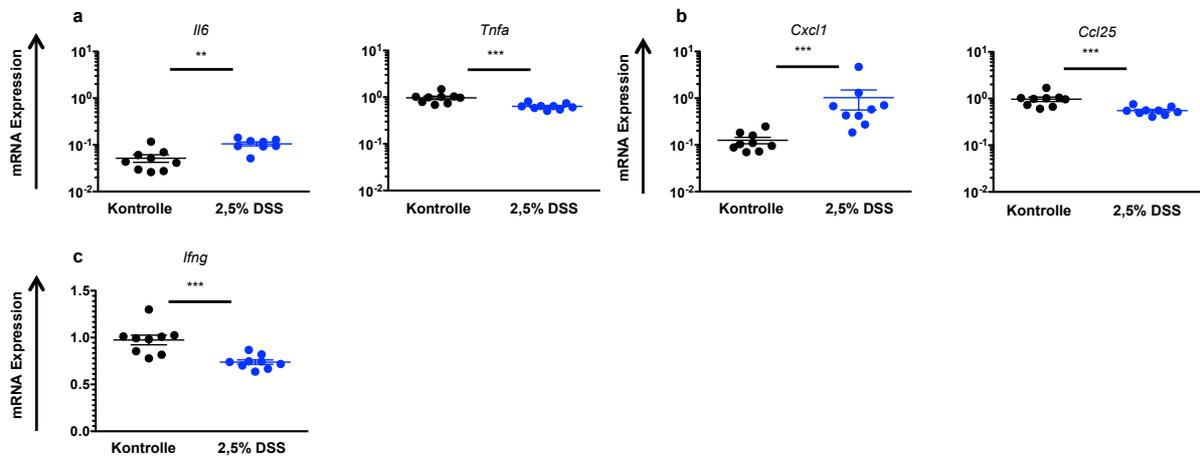


Abbildung 8: Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in der Leber am Ende einer chronischen DSS-Kolitis in Wildtyp Mäusen. Den Tieren wurde in insgesamt drei Zyklen 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht, zwischen den Zyklen erhielten sie autoklaviertes Leitungswasser. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM von jeweils neun Tieren je Versuchsgruppe. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney T-Test. **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. a) Expression von *Il6* und *Tnfa* in der Leber; b) Expression von *Cxcl1* und *Ccl25* in der Leber; c) Expression von *Ifng* in der Leber.

3.1.2 Transferkolitis in *Rag1*^{-/-} Mäusen

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob ein alternatives T-Zell-abhängiges Kolitismodell zu der Entstehung einer Leberpathologie führt. Bisher gab es immer wieder Berichte, dass T_H17 Zellen sowohl an der Pathogenese der Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen [56-58] als auch der PSC beteiligt sein sollen [82]. T_H1 Zellen scheinen zwar bei der Ausbildung einer Kolitis eine Rolle zu spielen [57], eine direkte Verbindung zur PSC konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden. Einige Arbeiten konnten bereits zeigen, dass der Transfer von *in vitro* differenzierten T_H1 und T_H17 Zellen in eine lymphopene Empfängermaus zu der Entwicklung einer Dickdarmentzündung führen kann [57].

Um die Rolle von T_H1 und T_H17 Zellen sowohl bei der Entstehung einer Kolitis als auch der Pathogenese einer PSC untersuchen zu können, wurden diese T-Zellsubpopulationen zunächst *in vitro* differenziert und anschließend in *Rag1*^{-/-} Mäuse transferiert. Als Kontrolle dienten dabei zum einen *Rag1*^{-/-} Mäuse, in die T_H0 Zellen transferiert wurden, zum anderen Tiere, die ausschließlich mit PBS behandelt wurden. Für die T-Zelldifferenzierung wurden naive T-Zellen aus den sekundären lymphatischen Organen (Milz, inguinale, axilläre und zervikale Lymphknoten) von Fir/Singer/IFN γ -Kat-Mäusen isoliert und unter speziellen Kulturbedingungen *in vitro* über einen Zeitraum von 4 Tagen in T_H0, T_H17 bzw. T_H1 Zellen differenziert. Die Isolation der Zellen aus der Kultur erfolgte mittels durchflusszytometrischer

Zellsortierung. Im Anschluss wurden jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen je *Rag1*^{-/-} Maus mittels *i.p.* Injektion injiziert. Die Tiere wurden regelmäßig endoskopiert und gewogen. Die zelluläre Analyse erfolgte zum Zeitpunkt der höchsten Entzündungsaktivität im Dickdarm.

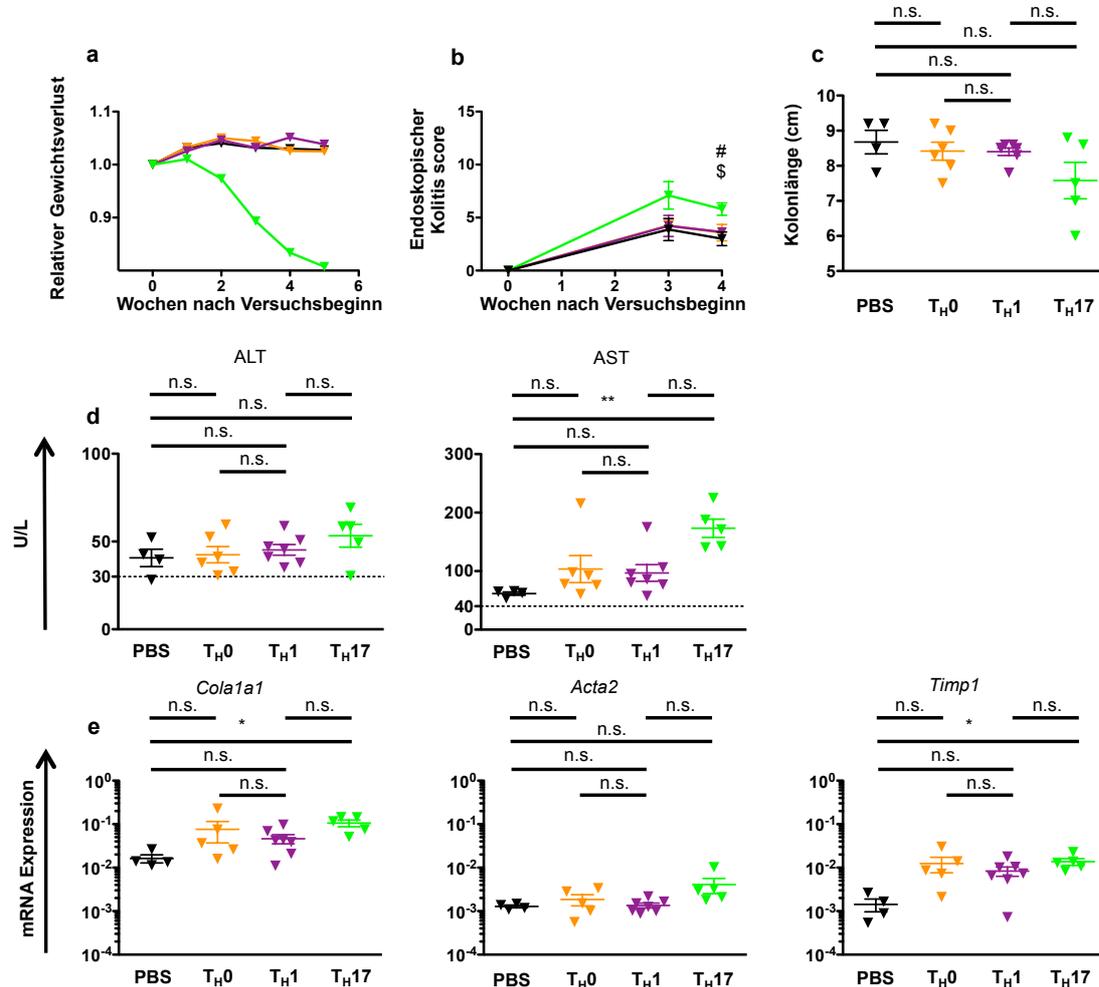


Abbildung 9: Klinische Parameter einer T-Zell-abhängigen Kolitis in *Rag1*^{-/-} Mäusen. TH0, TH1 und TH17 Zellen wurden *in vitro* differenzierte und jeweils 10^5 Zellen sowie PBS als unbehandelte Kontrolle in *Rag1*^{-/-} Mäusen mittels *i.p.* Injektion transferiert. In jeder Versuchsgruppe befanden sich vier bis sieben Tiere. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM, die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. **: $p \leq 0,01$; #: TH1 vs TH17 $p \leq 0,05$; \$: TH17 vs PBS $p \leq 0,05$. a) relativer Gewichtsverlust; b) Endoskopischer Kolitis score; c) Kolonlänge d) Lebertransaminasen aus venösem Blut; e) Expressionsanalyse profibrotischer Gene *Col1a1*, *Acta2* und *Timp1* aus Lebergewebe.

Wie an Hand des relativen Gewichtsverlusts sowie dem endoskopischen Kolitis Score zu erkennen ist, führte nur der Transfer von *in vitro* differenzierten TH17 Zellen zur Ausbildung einer milden Dickdarmentzündung (Abbildung 9a, b). Die Kolonlänge war jedoch nur in der Tendenz bei den Mäusen, die TH17 Zellen erhalten hatten, leicht verringert (Abbildung 9c). Bei der Betrachtung der Lebertransaminasen zeigte sich keine Auswirkung der Kolitis auf die leberspezifische ALT. Bei der AST fiel eine signifikante Erhöhung bei der TH17 Gruppe im Vergleich zu den Tieren die PBS erhalten hatten auf (Abbildung 9d). Sowohl die hepatische

Expression von Kollagen Typ I alpha 1 als auch von Timp1 waren in der Gruppe, die die T_H17 Zellen erhalten hatten im Vergleich zu den PBS-Kontrollen signifikant erhöht (Abbildung 9e).

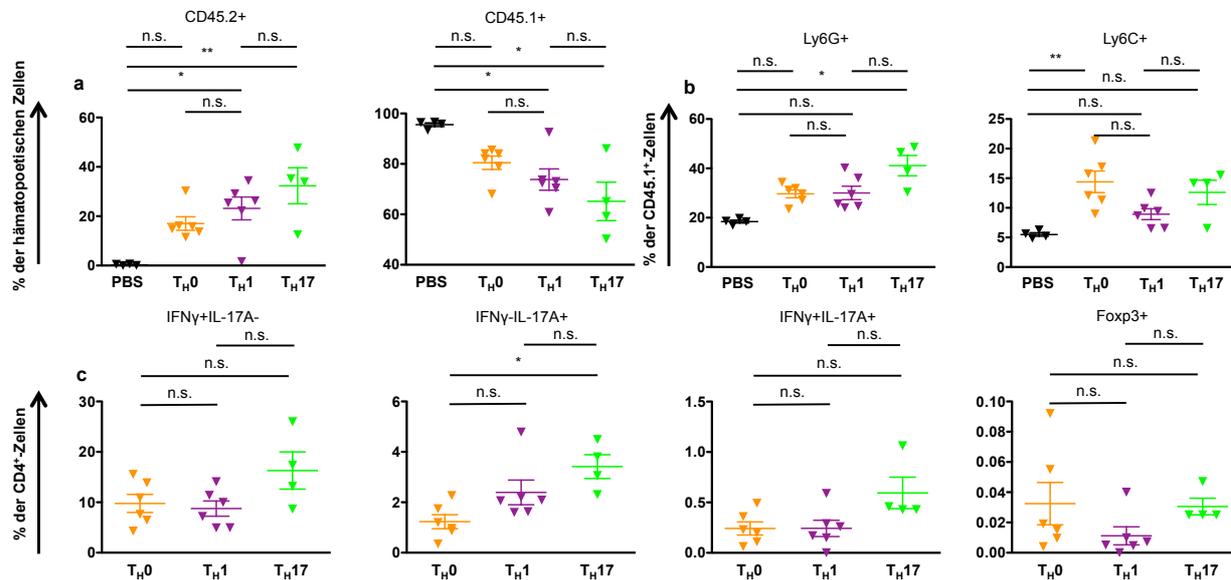


Abbildung 10: Analyse der unterschiedlichen CD4⁺ T-Zellen sowie der Zellen des angeborenen Immunsystems in der Leber bei einer T-Zell-abhängigen Kolitis in *Rag1*^{-/-}-Mäusen. T_H0, T_H1 und T_H17 Zellen wurden *in vitro* differenzierte und jeweils 10⁵ Zellen sowie PBS als unbehandelte Kontrolle in *Rag1*^{-/-}-Mäusen mittels *i.p.* Injektion transferiert. In jeder Versuchsgruppe befanden sich vier bis sieben Tiere. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM, die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01. a) Frequenz der CD45.2⁺- und CD45.1⁺-Zellen in der Leber; b) Frequenz der granulozytären und monozytären Zellen in der Leber; c) Frequenz der IFNγ⁺, IL-17A⁺, IL-17A⁺ und IFNγ⁺ doppelt positiven sowie Foxp3⁺ CD4⁺-T-Zellen in der Leber.

Wie bereits zuvor bei der DSS-Kolitis beobachtet, führte die Entzündung im Darm bei den Tieren, die T_H17 Zellen erhalten hatten zu einer erhöhten Frequenz an CD45.2⁺ Zellen in der Leber. Aber auch die Mäuse, in die T_H1 Zellen transferiert wurden, wiesen eine signifikante Erhöhung der Frequenz der CD45.2⁺ Zellen in der Leber auf. Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass die transferierten T-Zellen CD45.2⁺ und die *Rag1*^{-/-} Mäuse congen, also CD45.1⁺ waren. Die Frequenz der CD45.1⁺ Zellen war dem entsprechend bei den Tieren die T_H1 oder T_H17 Zellen erhalten hatten im Vergleich zu den Tieren die PBS erhalten hatten erniedrigt (Abbildung 10a). Bei der weiteren Analyse der T-Zellsubpopulation in der Leber zeigte sich, dass sich ausschließlich in der T_H17-Gruppe eine signifikant erhöhte Frequenz an T_H17 Zellen nachweisen lies. Für die T_H1, T_H1+T_H17 und T_{reg} Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede in den unterschiedlichen Versuchsgruppen festgestellt werden (Abbildung 10c). Bei der Betrachtung der Zellen des angeborenen Immunsystems zeigte sich, dass bei den mit T_H17 Zellen behandelten Mäusen im Vergleich zu der PBS-Gruppe die Frequenz der granulozytären Zellen signifikant erhöht war. Die monozytären Zellen waren dagegen in der

Versuchsgruppe, die T_H0 Zellen erhalten hatte, im Vergleich zu der PBS-Gruppe signifikant erhöht (Abbildung 10d).

Die Analyse der Expression der pro-inflammatorischen Cytokine *Il6* und *Tnfa* aus Lebergewebe zeigte, dass diese Gene insbesondere in den Lebern der Tiere verstärkt exprimiert wurden, die T_H17 Zellen erhalten hatten (Abbildung 11a). Passend zu den erhöhten Frequenzen an granulozytären Zellen in den Lebern von Tieren, die T_H17 Zellen erhalten hatten, war bei diesen Tieren ebenfalls die Expression des *Cxcl1* im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren erhöht (Abbildung 11b). Interessanterweise war bei diesen Tieren im Vergleich zu der PBS-Gruppe die Expression von *Ifng* in der Leber signifikant erhöht (Abbildung 11c). Die Detektion der *Il17a* Genexpression in der Leber war bei zu geringer Expression nicht möglich.

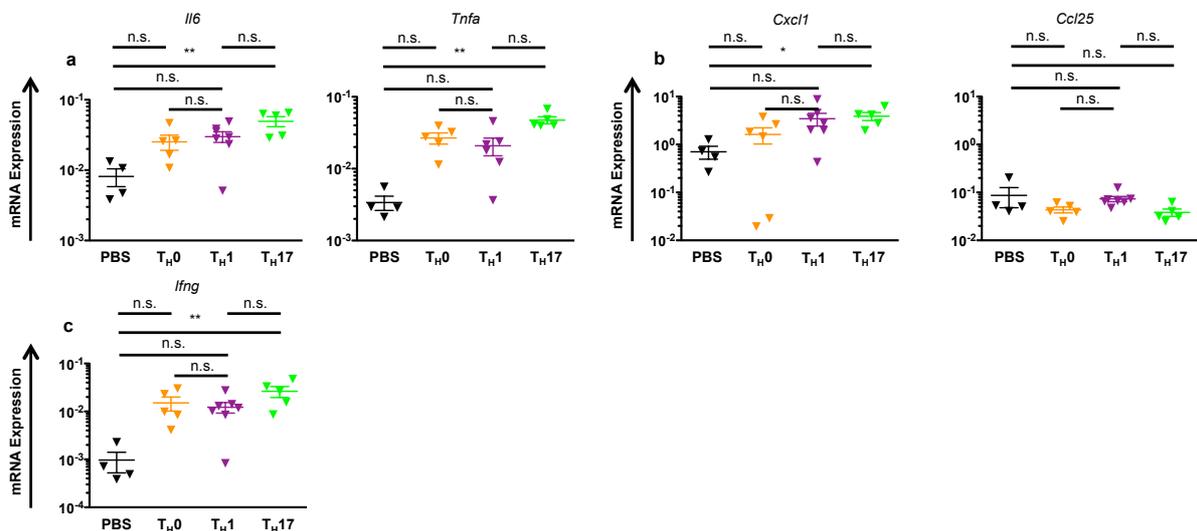


Abbildung 11: Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in der Leber am Ende einer T-Zell-abhängigen Kolitis in *Rag1*^{-/-} Mäusen. T_H0, T_H1 und T_H17 Zellen wurden *in vitro* differenzierte und jeweils 10⁵ Zellen sowie PBS als unbehandelte Kontrolle in *Rag1*^{-/-} Mäusen mittels *i.p.* Injektion transferiert. In jeder Versuchsgruppe befanden sich vier bis sieben Tiere. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM, die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. **: p ≤ 0,01. a) Expression von *Il6* und *Tnfa* in der Leber; b) Expression von *Cxcl1* und *Ccl25* in der Leber; d) Expression von *Ifng* in der Leber.

Abschließend kann festgehalten werden, dass lediglich der Transfer von *in vitro* differenzierten T_H17 Zellen zur Ausprägung einer milden Kolitis führte. Dabei konnte in der Leber jedoch nur eine milde Entzündung nachgewiesen werden. Die Transaminasen waren ausschließlich in Form der AST erhöht. Ähnlich wie bei der DSS-Kolitis kam es auch bei diesem Kolitis-Modell zu einer Akkumulation von pro-inflammatorischen Zellen mit einer verstärkten Expression von pro-inflammatorischen Genen in der Leber.

Auf der Grundlage der Vorarbeiten mit der DSS-Kolitis in Wildtyp-Mäusen und der Transferkolitis in *Rag1*^{-/-} Mäusen stellte sich als nächstes die Frage, ob eine Kolitis den PSC-ähnlichen Phänotyp in genetisch prädisponierten Tieren verstärken würde.

3.2 Einfluss einer DSS-Kolitis auf die Leberpathologie bei Tieren mit einem PSC-ähnlichen Phänotyp

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die DSS-Kolitis zu einer Akkumulation von Immunzellen in der Leber führte, sollte nun der Einfluss einer Kolitis auf eine bereits bestehende Leberpathologie untersucht werden. Dafür wurde im nächsten Schritt eine DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäuse induziert.

3.2.1 Akute DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-} Mäusen

Zunächst wurden 12-14 Wochen alte *Mdr2*^{-/-} Mäusen in alters- und geschlechtsausgeglichene Gruppen eingeteilt und über einen Zeitraum von sieben Tagen mit 2,5 % DSS im Trinkwasser *ad libitum* behandelt. Am siebten Tag wurde das DSS abgesetzt und durch autoklaviertes Leitungswasser ersetzt. Die Kontrolltiere erhielten während des gesamten Versuchs autoklaviertes Leitungswasser. Um den Krankheitsverlauf zu beobachten, erfolgte die regelmäßige Gewichtskontrolle der Tiere. Wie bereits bei der akuten DSS-Kolitis in Wildtyp Mäusen zuvor gezeigt, war der Zeitpunkt der höchsten Entzündungsaktivität sowohl im Kolon als auch in der Leber zwischen den Tagen 9 und 11. Aus diesem Grund erfolgte an den Tagen 0, 9 und 11 die Beurteilung der Entzündungsausprägung mit Hilfe eines Kleintierendoskops. Die Organe zur zellulären Analyse wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen.

Wie durch den relativen Gewichtsverlust, den Kolitis-Score, die Kolonlänge und der absoluten Leukozytenzahl im Kolon in der Abbildung 12a-d zu erkennen ist, kam es innerhalb von wenigen Tagen zu einer deutlich ausgeprägten Dickdarmentzündung. Der Zeitpunkt der stärksten Entzündung schien dabei um den Tag 9 zu liegen. Betrachtet man die Histopathologie der Leber, so fällt zunächst einmal auf, dass die Leberpathologie in Form von Entzündung und Fibrose zumindest nicht durch eine zeitgleich bestehende Kolitis verschlechtert wurde (Abbildung 12e, f+h). Bei der genaueren Betrachtung der Fibrose kam es bei den mit DSS behandelten Tieren, im Vergleich zur Kontrollgruppe, sogar zu einer signifikant reduzierten Fibrose. Zu dieser Beobachtung passt auch, dass an Tag 11 der akuten Kolitis eine signifikant reduzierte Expression des *Col1a1*-Gens gemessen wurde, während die anderen pro-fibrotischen Gene jedoch nicht beeinflusst wurden (Abbildung 12i). Bei der Analyse der Lebertransaminasen aus dem venösen Blut zeigte sich, dass es zumindest klinisch-chemisch zu einem reduzierten Leberparenchymschaden während einer akuten DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-} Mäusen gekommen ist (Abbildung 12g).

Resultate

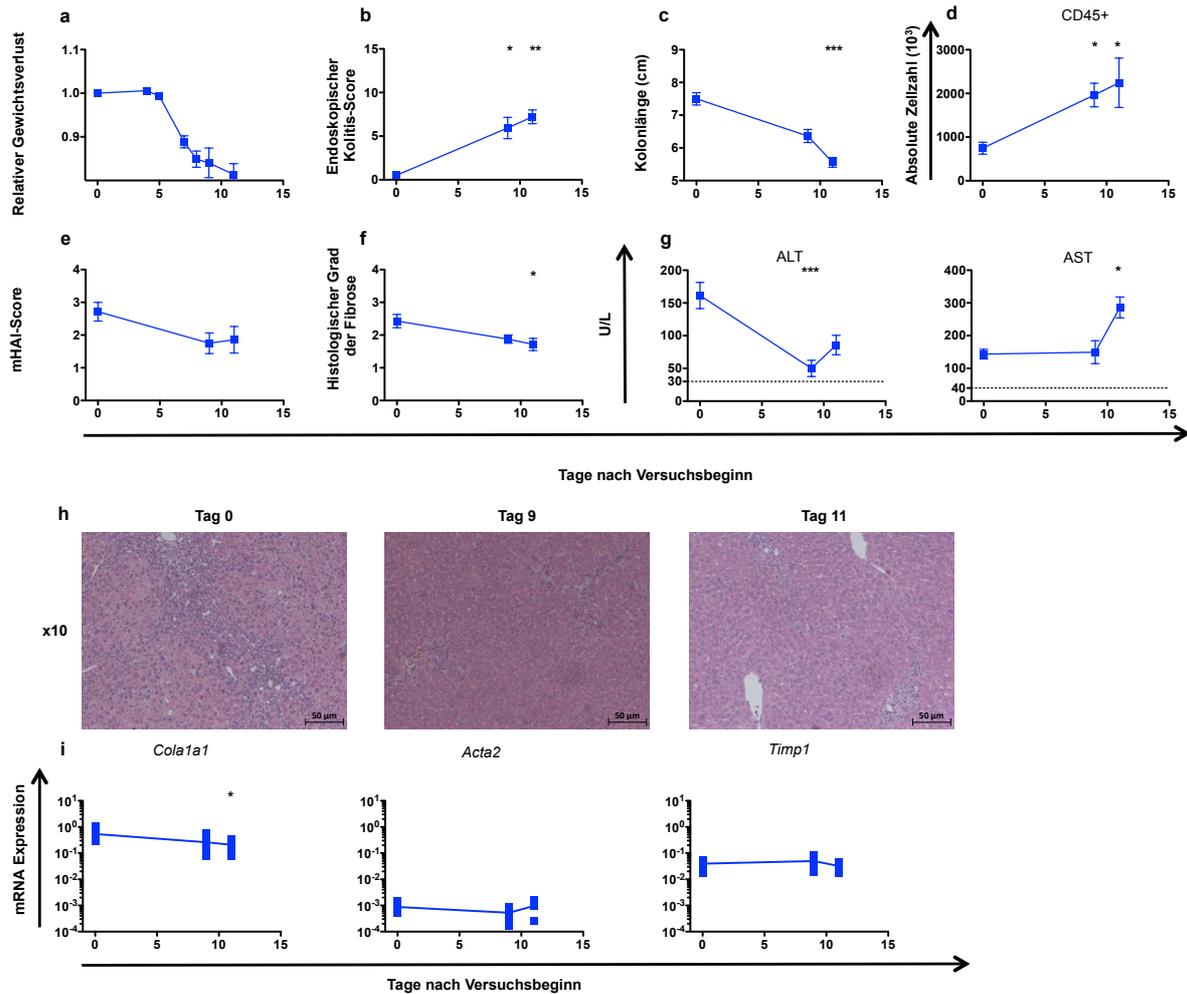


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der klinischen Verlaufparameter einer akuten DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht. Dargestellt ist der Mittelwert und der SEM von jeweils sieben Tieren an den Tagen 0 und 11, sowie acht Tiere an Tag 9. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. Die Signifikanzen (*) beziehen sich jeweils auf die Kontrollen zum Zeitpunkt 0. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. a) relativer Gewichtsverlust; b) Endoskopischer Kolitis-Score; c) Kolonlänge; d) Absolute Zellzahl der aus Kolongewebe isolierten Leukozyten; e) histopathologische Beurteilung der Entzündungsaktivität in der Leber an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; f) histopathologische Beurteilung der Leberfibrose an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; g) Lebertransaminasen aus venösem Blut; h) repräsentative, HE-gefärbte histologische Bilder der Leber von Tag 0, 9 und 11 in 10-facher Vergrößerung; i) Expressionsanalyse pro-fibrotischer Gene *Cola1a1*, *Acta2* und *Timp1* aus Lebergewebe.

Ähnlich wie in der akuten DSS-Kolitis in Wildtyp Mäusen, so scheint es auch bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen während einer Dickdarmentzündung zu einer Akkumulation von Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems in die Leber gekommen zu sein. Bei genauerer Betrachtung der CD4⁺ T-Zellen zeigte sich, dass unter den einwandernden Zellen insbesondere IFN γ und IL-17A produzierende Zellen zu finden waren (Abbildung13). Auch in den Lebern DSS-behandelter *Mdr2*^{-/-} Mäuse konnte ein leichter Anstieg Foxp3⁺ T-Zellen nachgewiesen werden.

Resultate

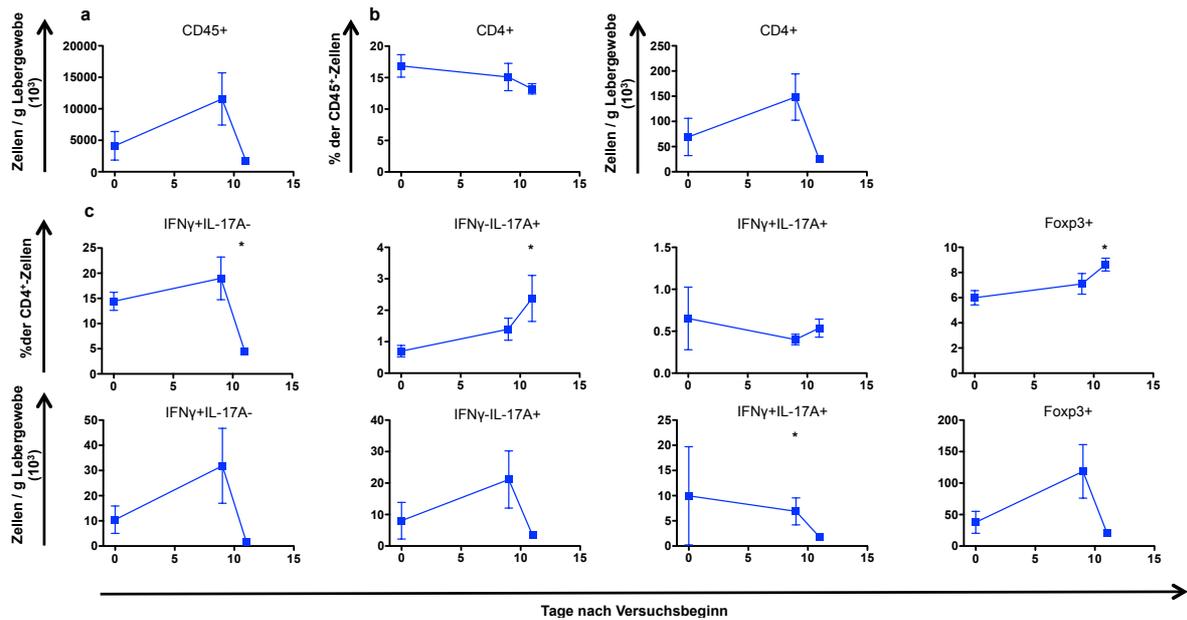


Abbildung 13: Analyse der unterschiedlichen CD4⁺ T-Zellen in der Leber im Verlauf einer akuten DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM von jeweils sieben Tieren an den Tagen 0 und 11, sowie von acht Tiere an Tag 9. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. Die Signifikanzen (*) beziehen sich jeweils auf die Kontrollen zum Zeitpunkt 0. *: $p \leq 0,05$. a) Absolute Zellzahl der CD45⁺ Zellen; b) Frequenz und absolute Zellzahl der CD4⁺ T-Zellen; c) Frequenz und absolute Zellzahl der IFN γ ⁺, IL-17A⁺, IL-17A⁺ und IFN γ ⁺ doppelt positiven sowie Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen.

Bei der Betrachtung der Zellen des angeborenen Immunsystems fiel auf, dass sowohl granulozytäre als auch monozytäre Zellen in Frequenz und absoluter Zellzahl während einer akuten Entzündung im Kolon und in der Leber akkumulierten (Abbildung 14).

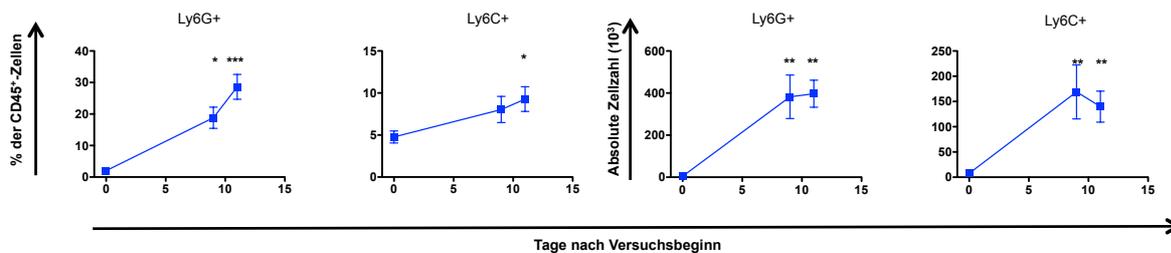


Abbildung 14: Frequenz und absolute Zellzahl der granulozytären und monozytären Zellen in der Leber während einer akuten DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen 2,5% DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM von jeweils sieben Tieren an den Tagen 0 und 11, sowie von acht Tiere an Tag 9. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. Die Signifikanzen (*) beziehen sich jeweils auf die Kontrollen zum Zeitpunkt 0. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

Bei der Analyse der Expression pro-inflammatorischer Gene in der Leber zeigte sich auch in diesem Fall, dass es zu einer verstärkten Expression von *Il6* in den Lebern der Behandlungsgruppe kam, während die Genexpression von *Tnfa* durch die Entzündung im Darm nicht beeinflusst wurde (Abbildung 15a). Zusätzlich zeigten die Lebern nach der DSS-

Behandlung eine signifikant erhöhte Expression des *Il17a* Gens während das *Ifng* Gen nicht beeinflusst wurde (Abbildung 15b).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Kinetik der Akkumulation von Immunzellen, insbesondere die des angeborenen Immunsystems, in den Lebern von *Mdr2*^{-/-} Mäusen während einer akuten DSS-Kolitis vergleichbar war mit den Beobachtungen, die in den Wildtyp Mäusen gemacht werden konnten. Unerwarteter Weise führte die akute DSS-Kolitis bei den *Mdr2*^{-/-} Mäusen jedoch zu reduzierten Lebertransaminasen und einer verringerten Fibrose.

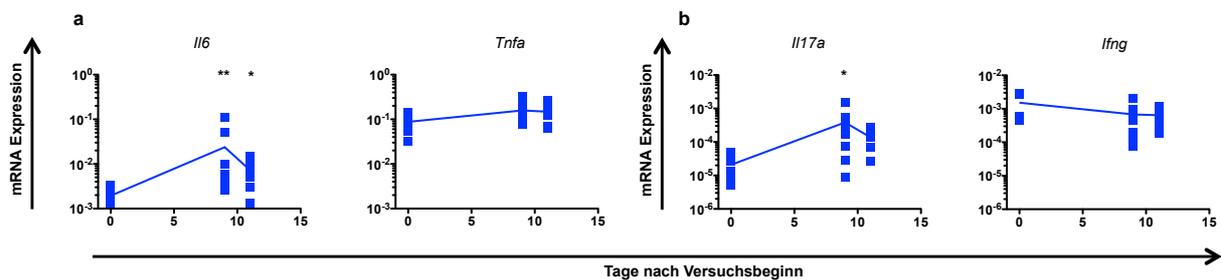


Abbildung 15: Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in der Leber während einer akuten DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen 2,5% DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM, die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$. a) Expression von *Il6* und *Tnfa* in der Leber; b) Expression von *Il17a* und *Ifng* in der Leber.

3.2.2 Chronische DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-} Mäusen

In Vorversuchen aus der Arbeitsgruppe konnte in der chronischen DSS-Kolitis bei 12-14 Wochen alten *Mdr2*^{-/-} Mäusen gezeigt werden, dass es, wie bei den Wildtyp Mäusen, zu einer Infiltration von Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems kam. Interessanterweise kam es bei den behandelten Tieren zwar histopathologisch zu einem leicht verstärkten Bild der Entzündung, der Grad der Fibrose war bei diesen Tieren jedoch signifikant reduziert. Außerdem fiel bei den behandelten Mäusen, wie bereits bei der akuten DSS-Kolitis, eine signifikante Reduktion der Lebertransaminasen auf.

Da *Mdr2*^{-/-} Mäuse bereits kurze Zeit nach der Geburt eine Leberpathologie aufweisen, die zunächst eher durch eine Hepatitis charakterisiert ist und erst im Verlauf zunehmend zu einer Fibrosierung führt [45, 47], stellte sich die Frage, ob das Alter und damit der Grad der Fibrosierung einen Einfluss auf die Leberpathologie während einer chronischen DSS-Kolitis haben könnte. Aus diesem Grund wurde eine chronische DSS-Kolitis bei 6-8 Wochen alten Tieren induziert.

Resultate

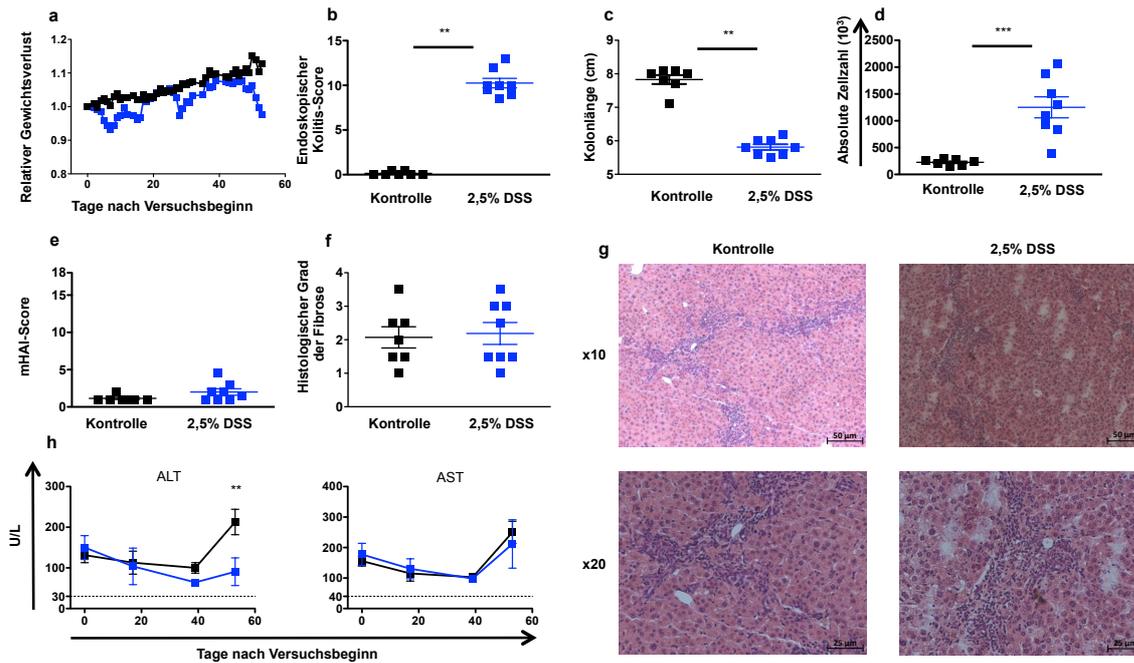


Abbildung 16: Klinische Parameter einer chronischen DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Den Tieren wurde in insgesamt drei Zyklen 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht, zwischen den Zyklen erhielten sie autoklaviertes Leitungswasser. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM von sieben Tieren in der Kontrollgruppe und acht Tieren in der Behandlungsgruppe, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney T-Test für die Abbildungen a-e. Für die Abbildung f erfolgte die statistische Analyse mittels ANOVA, dabei bezogen sich die Signifikanzen (*) jeweils auf die Kontrollen zum getesteten Zeitpunkt. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. a) relativer Gewichtsverlust; b) Endoskopischer Kolitis-Score; c) Kolonlänge; d) Absolute Zellzahl der aus Kolongewebe isolierten Leukozyten; e) histopathologische Beurteilung der Entzündungsaktivität in der Leber an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; f) histopathologische Beurteilung der Leberfibrose an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; g) repräsentative, HE-gefärbte histologische Bilder der Leber von Tag 0, 9 und 11 in 10-facher (obere Reihe) und 20-facher (untere Reihe) Vergrößerung; h) Lebertransaminasen aus venösem Blut.

Die chronische DSS-Kolitis erfolgte in alters- und geschlechtsangepassten Gruppen von sechs bis acht Wochen alten *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 51 Tagen mit insgesamt drei Zyklen 2,5 % DSS im Trinkwasser *ad libitum* behandelt. In den ersten beiden Zyklen erfolgte die DSS-Applikation für jeweils fünf Tage. Der dritte und letzte Zyklus dauerte sieben Tage. Zwischen den DSS-Behandlungen lagen jeweils Erholungsphasen von 16 Tagen, in denen den Tieren autoklaviertes Leitungswasser angeboten wurde. Am ersten Tag nach dem Absetzen des DSS des letzten Zyklus wurden die Tiere endoskopiert, am darauffolgenden Morgen erfolgte die Organentnahme zur zellulären Analyse. Die Kontrolltiere erhielten während des gesamten Versuchs autoklaviertes Leitungswasser. Das Gewicht der Mäuse wurde regelmäßig überwacht.

Wie an dem Gewichtsverlauf, dem Kolitis-Score, der Kolonlänge sowie der absoluten Leukozytenzahl im Kolongewebe (Abbildung 16a-c) zu erkennen ist, konnte bei den jungen Tieren erfolgreich eine DSS-Kolitis induziert werden. Betrachtet man die histopathologische Begutachtung der Leber so fällt auf, dass die DSS-behandelten Tiere zwar einen leicht

erhöhten Hepatitis-Score aufwiesen, der Grad der Fibrose sich jedoch in keiner Weise zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren unterschied (Abbildung 16e-g). In Hinblick auf die Lebertransaminasen fiel auf, dass auch in diesem Fall die behandelten Tiere signifikant reduzierte Werte aufwiesen (Abbildung 16h).

Bei Betrachtung der zellulären Analyse der CD4⁺ T-Zellen in der Leber zeigten sich erhöhte Frequenzen und absolute Zellzahlen der T_H17 und T_H1+T_H17 Zellen in der DSS-behandelten Gruppe. Bei den T_H1 und T_{reg} Zellen konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe festgestellt werden. (Abbildung 17).

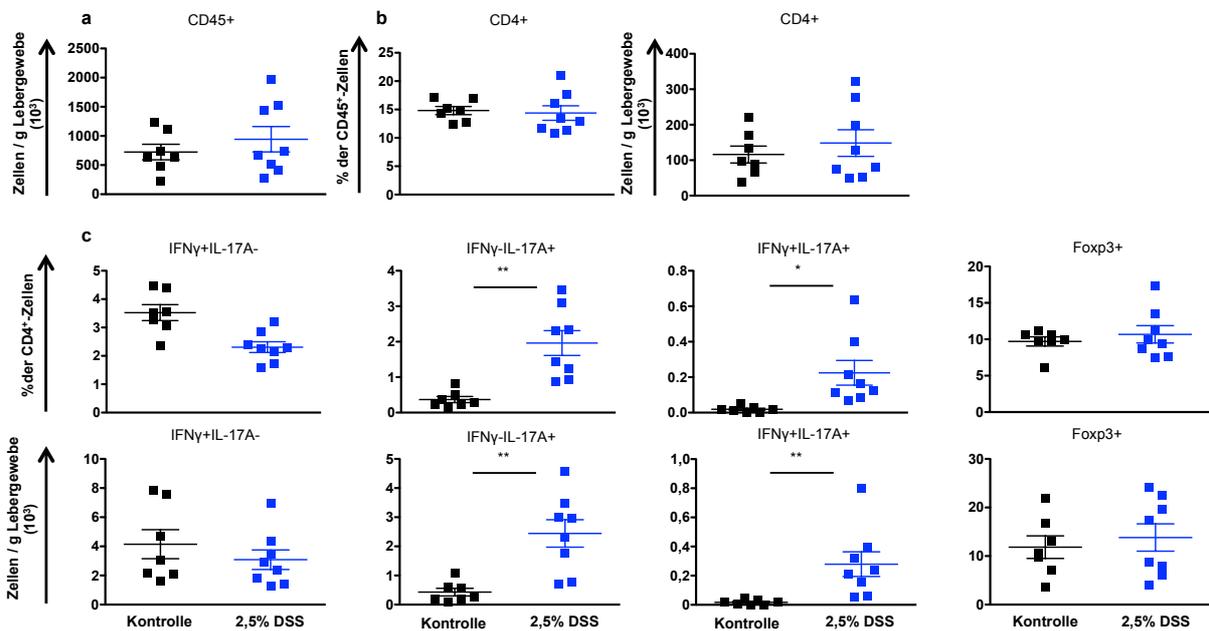


Abbildung 17: Analyse der unterschiedlichen CD4⁺ T-Zellen in der Leber am Ende einer chronischen DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Den Tieren wurde in insgesamt drei Zyklen 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht, zwischen den Zyklen erhielten sie autoklaviertes Leitungswasser. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM von sieben Tieren in der Kontrollgruppe und acht Tieren in der Behandlungsgruppe, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney T-Test. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$. a) Absolute Zellzahl der CD45⁺ Zellen; b) Frequenz und absolute Zellzahl der CD4⁺ T-Zellen; c) Frequenz und absolute Zellzahl der IFN γ ⁺, IL-17A⁺, IL-17A⁺ und IFN γ ⁺ doppelt positiven sowie Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen.

Bei der Analyse der Zellen des angeborenen Immunsystems zeigte sich, dass sowohl Frequenz als auch die absolute Zellzahl von granulozytären und monozytären Zellen in den Lebern behandelter Tiere signifikant erhöht waren (Abbildung 18).

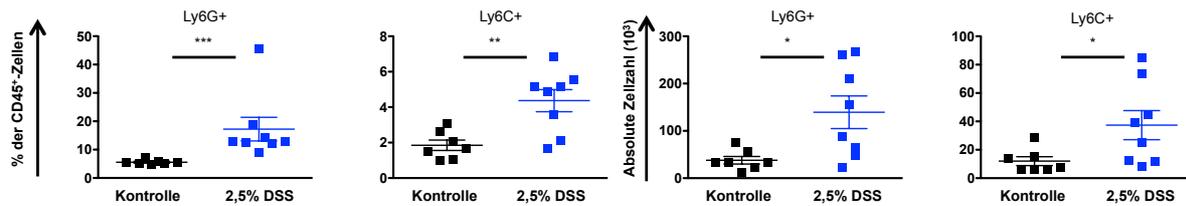


Abbildung 18: Frequenz und absolute Zellzahl der granulozytären und monozytären Zellen in die Leber nach einer chronischen DSS-Kolitis in *Mdr2^{-/-}* Mäusen. Den Tieren wurde in insgesamt drei Zyklen 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht, zwischen den Zyklen erhielten sie autoklaviertes Leitungswasser. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM von sieben Tieren in der Kontrollgruppe und acht Tieren in der Behandlungsgruppe, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney T-Test. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine chronische DSS-Kolitis bei *Mdr2^{-/-}* Mäusen ebenso wie bei den Wildtyp-Mäusen zu einer erhöhten Frequenz und Anzahl an T_{H17} und $T_{H1}+T_{H17}$ Zellen, sowie der Zellen des angeborenen Immunsystems in der Leber führte. T_{H1} und T_{reg} Zellen waren dagegen nicht in erhöhtem Maße in den Lebern der behandelten Tiere nachweisbar. Des Weiteren fiel auf, dass, wie bereits für die akute DSS-Kolitis bei *Mdr2^{-/-}* Mäusen beobachtet, die Transaminasen der Tiere in der Behandlungsgruppe deutlich reduziert waren. Die Fibrose war dagegen bei den Versuchsgruppen nicht signifikant beeinflusst.

3.2.3 Auswirkung einer akuten DSS-Kolitis bei Wildtyp Mäusen mit einer chemisch induzierten Leberpathologie

Anders als erwartet, führten sowohl eine akute als auch eine chronische DSS-Kolitis bei *Mdr2^{-/-}* Mäusen zu keiner Verschlechterung der Leberpathologie. Stattdessen zeigte sich eher die Tendenz zu einer reduzierten Fibrose und verringerten Lebertransaminasen. Um zu prüfen, ob diese Beobachtung durch die Form des gewählten Mausmodells bedingt war, wurde bei einem chemisch induzierten Mausmodell für die PSC eine akute DSS-Kolitis induziert.

Um chemisch einen PSC-ähnlichen Phänotypen zu induzieren, wurden acht Wochen alte Wildtyp Mäuse in alters- und geschlechtsausgeglichene Gruppen eingeteilt und über einen Zeitraum von vier Wochen *ad libitum* mit einem Diethyl-1,4-Dihydro-2,4,6-trimethyl-3,5-pyridinedicarboxylat (DDC)-haltigen Futter gefüttert. Nach einer viertägigen Remissionsphase erfolgte die Induktion einer akuten DSS-Kolitis. Zwei Tage nach Absetzen des DSS wurden die Organe zur zellulären Analyse entnommen. Zur klinischen Kontrolle wurden die Tiere regelmäßig gewogen und einen Tag vor der Organentnahme endoskopierte. Als Kontrollgruppe dienten Wildtyp Mäuse, die autoklaviertes Leitungswasser erhielten.

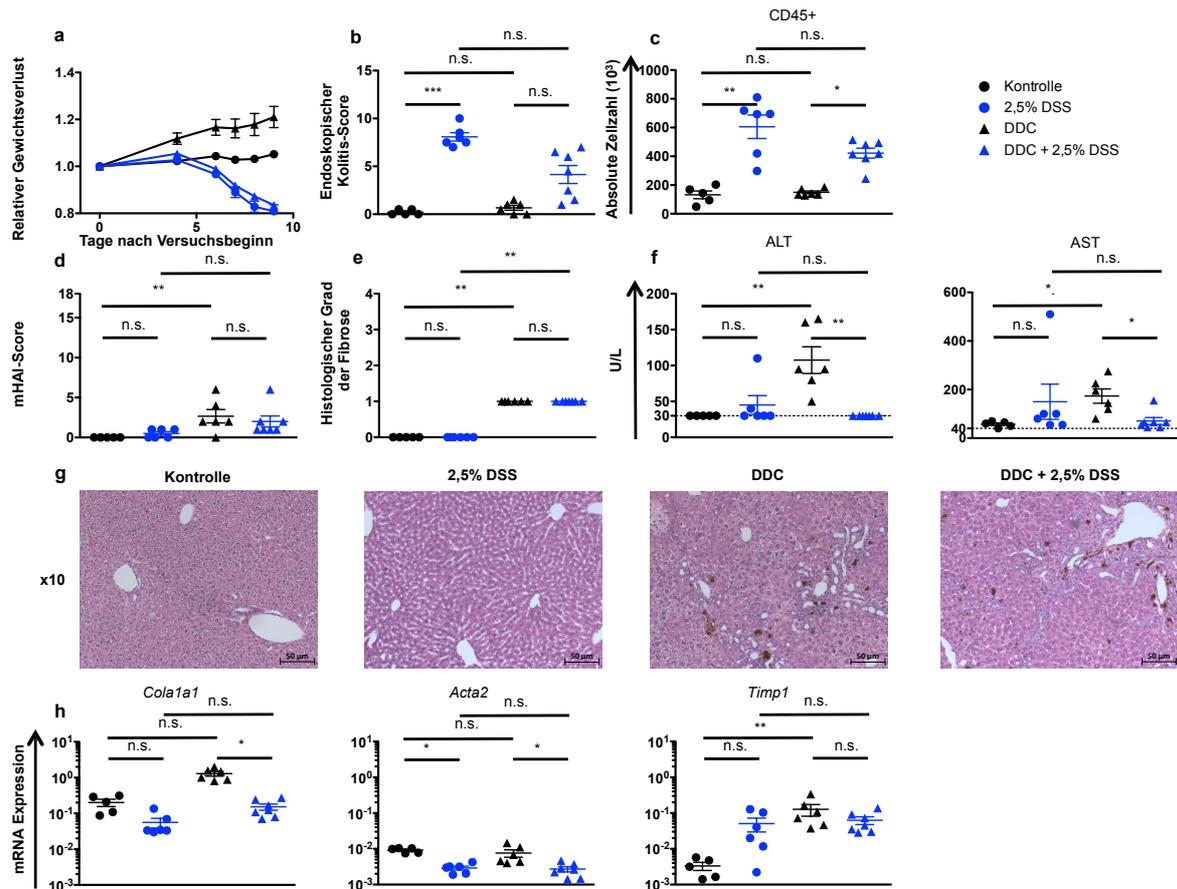


Abbildung 19: Klinische Parameter einer akuten DSS-Kolitis bei mit DDC vorbehandelten Wildtyp Mäusen. Zunächst erhielten die Tiere DDC-haltiges Futter über einen Zeitraum von 4 Wochen. Vier Tage nach Austausch des DDC-Futters durch herkömmliches Futter, erhielten die Tiere über 7 Tage 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser. Zwei Tage nach Absetzen des DSS erfolgte die Organentnahme. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. Die Abbildungen zeigen den arithmetischen Mittelwert sowie den SEM, die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. Jedes dargestellte Symbol in den Abbildungen repräsentiert ein Versuchstier. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; n.s.: nicht signifikant. a) relativer Gewichtsverlust; b) Endoskopischer Kolitis-Score; c) Absolute Zellzahl der aus Kolongewebe isolierten Leukozyten d) histopathologische Beurteilung der Entzündungsaktivität in der Leber an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; e) histopathologische Beurteilung der Leberfibrose an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; f) Lebertransaminasen aus venösem Blut; g) repräsentative, HE-gefärbte histologische Bilder der Lebern 10-facher Vergrößerung; h) Expressionsanalyse pro-fibrotischer Gene *Cola1a1*, *Acta2* und *Timp1* aus Lebergewebe.

Erwartungsgemäß führte die chronische Behandlung der Tiere mit dem DDC-haltigen Futter zu einer Hepatitis sowie einer Fibrosierung der Leber (Abbildung 19c-e). Wie aus dem Gewichtsverlauf in Abbildung 19a zu erkennen ist, führte die Applikation von DSS im Anschluss an die DDC-Behandlung zu einem Gewichtsverlust, der sich bei den beiden Kolitisgruppen nicht signifikant unterschied. In der Endoskopie zeigte sich bei der doppelt behandelten Versuchsgruppe ein in der Tendenz leicht reduzierter Kolitis-Score im Vergleich zu der Gruppe, die nur DSS erhalten hatte. Ein ähnlicher Befund konnte bei der Bestimmung der absoluten Leukozytenzahl aus Kolongewebe erhoben werden (Abbildung 19c). Bei der histopathologischen Auswertung der Lebergewebsproben zeigte sich, dass die doppelt behandelte Versuchsgruppe im Vergleich zu der Gruppe, die ausschließlich DDC erhalten

hatte, einen leicht reduzierten Entzündungswert aufwies (Abbildung 19d). Bei der Betrachtung der Fibrose konnte hingegen kein Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen festgestellt werden (Abbildung 19e). Bei der Analyse der Expression pro-fibrotischer Gene in der Leber zeigte sich dagegen, dass die Tiere, die sowohl DDC als auch DSS erhalten hatten im Vergleich zu denen, die nur DDC erhielten, eine signifikant reduzierte Expression von *Col1a1* und *Acta2* aufwiesen (Abbildung 19h). Interessanterweise wurde bei den doppelt behandelten Tieren im Vergleich zu den Tieren, die ausschließlich DDC erhalten hatten, signifikant reduzierte Transaminasewerte gemessen (Abbildung 19f).

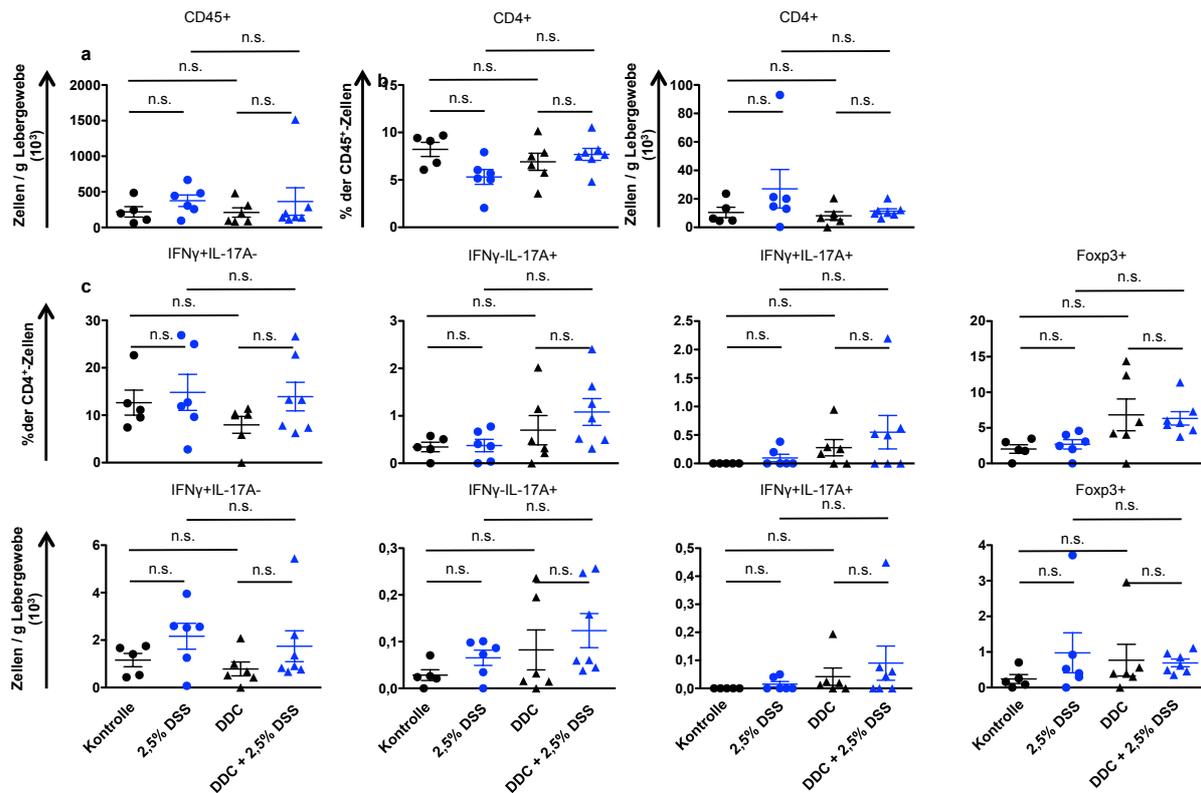


Abbildung 20: Analyse der unterschiedlichen CD4⁺ T-Zellen in der Leber am Ende einer akuten DSS-Kolitis bei mit DDC vorbehandelten Wildtyp Mäusen. Zunächst erhielten die Tiere DDC-haltiges Futter über einen Zeitraum von 4 Wochen. Vier Tage nach Austausch des DDC-Futters durch herkömmliches Futter, erhielten die Tiere über 7 Tage 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser. Zwei Tage nach Absetzen des DSS erfolgte die Organentnahme. Die Abbildungen zeigen den arithmetischen Mittelwert sowie den SEM, die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. Jedes dargestellte Symbol in den Abbildungen repräsentiert ein Versuchstier. n.s.: nicht signifikant. a) Absolute Zellzahl der CD45⁺ Zellen; b) Frequenz und absolute Zellzahl der CD4⁺ T-Zellen; c) Frequenz und absolute Zellzahl der IFN γ ⁺, IL-17A⁺, IL-17A⁺ und IFN γ ⁺ doppelt positiven sowie Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen.

Bei der Analyse der unterschiedlichen Subpopulationen der CD4⁺ T-Zellen in der Leber am Versuchsende konnten in den unterschiedlichen Versuchsgruppen zwar in der Tendenz erhöhte, jedoch nicht signifikante Frequenzen und absolute Zellzahlen festgestellt werden (Abbildung 20). Dabei zeigten die Tiere, die eine Doppelbehandlung erhalten hatten, jeweils die höchsten Frequenzen und absoluten Zellzahlen für die T_H17 und T_H1+T_H17 Subpopulationen.

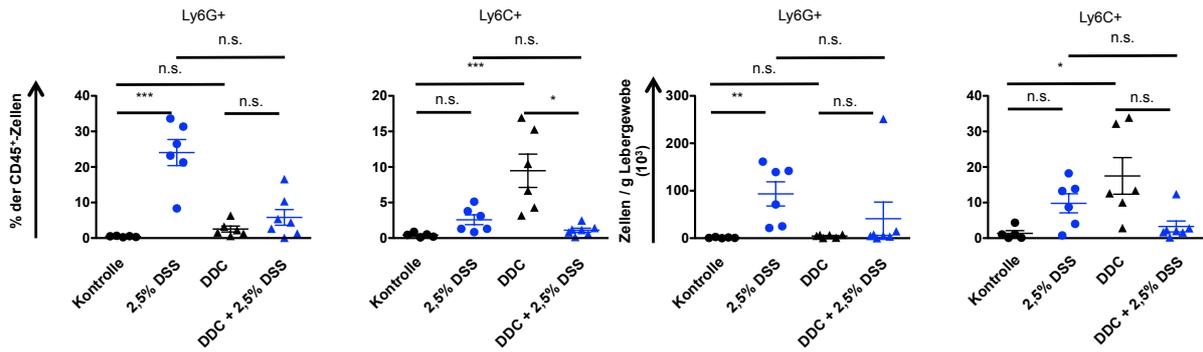


Abbildung 21: Frequenz und absolute Zellzahl der granulozytären und monozytären Zellen in die Leber nach einer akuten DSS-Kolitis bei mit DDC vorbehandelten Wildtyp Mäusen. Zunächst erhielten die Tiere DDC-haltiges Futter über einen Zeitraum von 4 Wochen. Vier Tage nach Austausch des DDC-Futters durch herkömmliches Futter, erhielten die Tiere über 7 Tage 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser. Zwei Tage nach Absetzen des DSS erfolgte die Organentnahme. Die Abbildungen zeigen den arithmetischen Mittelwert sowie den SEM, die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; n.s.: nicht signifikant.

Bei der Analyse der Zellen des angeborenen Immunsystems waren die granulozytären Zellen insbesondere bei der nur mit DSS behandelten Versuchsgruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant in Frequenz und Anzahl in der Leber erhöht (Abbildung 21). Interessanterweise waren die monozytären Zellen insbesondere in der Gruppe, die nur mit DDC behandelt wurde, in Frequenz und absoluter Zellzahl signifikant erhöht. Die Doppelbehandlung führte sogar zu einer signifikanten Reduktion der Frequenz der monozytären Zellen in der Leber.

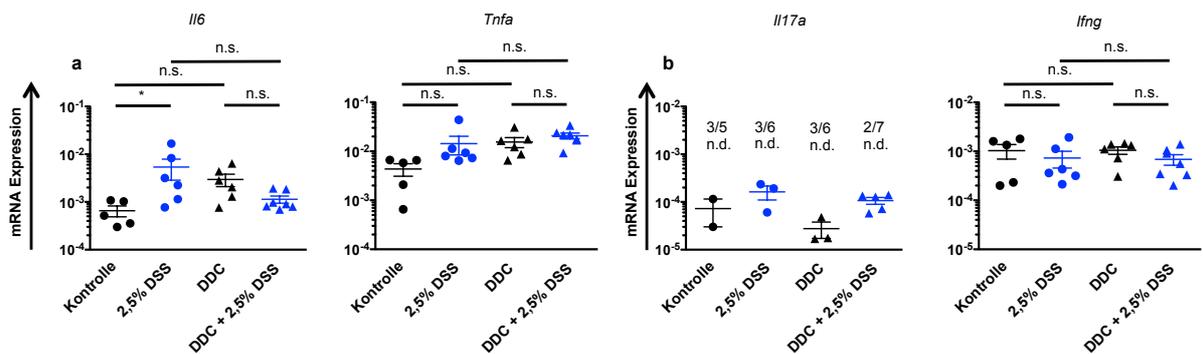


Abbildung 22: Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in der Leber nach einer akuten DSS-Kolitis bei mit DDC vorbehandelten Wildtyp Mäusen. Zunächst erhielten die Tiere DDC-haltiges Futter über einen Zeitraum von 4 Wochen. Vier Tage nach Austausch des DDC-Futters durch herkömmliches Futter, erhielten die Tiere über 7 Tage 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser. Zwei Tage nach Absetzen des DSS erfolgte die Organentnahme. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM, die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. *: $p \leq 0,05$; n.d.: nicht detektiert; n.s.: nicht signifikant. a) Expression von *Il6* und *Tnfa* in der Leber; b) Expression von *Il17a* und *Ifng* in der Leber.

Die Expressionsanalyse der pro-inflammatorischen Gene (Abbildung 22) in der Leber zeigte, dass *Il6* nur in den Lebern der Tiere signifikant erhöht war, die ausschließlich DSS erhalten hatten. Für *Tnfa* konnten keine Unterschiede in den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt werden. Die Expression von *Il17a* und *Ifng* in der Leber zeigte keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Versuchsgruppen.

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass eine akute DSS-Colitis bei DDC-behandelten Mäusen, ähnlich wie bei den *Mdr2*^{-/-} Mäusen, zu deutlich reduzierten Transaminasen führte. Der Grad der Leberentzündung, die Akkumulation von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in der Leber, sowie die Fibrose waren in diesem Fall jedoch nicht signifikant durch die DSS-Behandlung beeinflusst.

3.3 Kommen die Zellen, die im Rahmen einer Kolitis in der Leber akkumulieren direkt aus dem Kolon und welche Zellgruppen migrieren überwiegend aus dem Kolon in die Leber?

Wie bereits für die akute und chronische DSS-Kolitis in Wildtyp und *MDR2*^{-/-} Mäusen berichtet wurde, kam es im Rahmen der intestinalen Entzündung zu einer gesteigerten Infiltration von Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems in die Leber. Dabei stellte sich die Frage, ob diese Zellen direkt aus dem entzündeten Gewebe in die Leber einwanderten.

Um diese Frage zu beantworten, wurden Mäuse verwendet, die das transgene Protein KAEDE exprimierten. Dieses unter der Kontrolle des CAG-Promotors ubiquitär exprimierte, grünfluoreszierende Protein hat die Eigenschaft nach Bestrahlung mit UV-Licht durch photokatalytische Prozesse eine irreversible Strukturänderung zu erfahren und dadurch anschließend rot zu fluoreszieren. Dieser Prozess wird als Photokonversion bezeichnet.

Mit dem Ziel, die migratorischen Eigenschaften der während einer Kolitis im Kolon vorhandenen proinflammatorischen Zellen zu erforschen, sollte während einer Kolitis bei *Kaede* Mäusen mit Hilfe eines Kleintierendoskops, das an eine UV-Lichtquelle angeschlossen war, die Photokonversion im Kolon vollzogen werden. Anschließend sollte in den Lebern der Tiere nach photokonvertierten Zellen gesucht und diese weiter charakterisiert werden.

3.3.1 Spezifische, endoskopische Photokonversion von *Kaede* Zellen im Kolon

Um nachzuweisen, dass während der endoskopischen Photokonversion ausschließlich Zellen aus dem Kolon photokonvertierten, wurden drei *Kaede* Mäuse über einen Zeitraum von drei Minuten mittels eines Kleintierendoskops, das an eine UV-Lichtquelle angeschlossen war, dem UV-Licht ausgesetzt. Unmittelbar anschließend wurden hämatopoetische Zellen aus Kolon, Leber und Milz isoliert und durchflusszytometrisch auf den Anteil an KAEDE-rot⁺ Zellen untersucht. Wie aus der Abbildung 23 zu entnehmen ist, erfolgte die Photokonversion spezifisch in den distalen 4 cm des Kolons. Dabei war die höchste Effizienz der Photokonversion bei den intraepithelialen Zellen zu sehen. In der Leber und der Milz konnten unmittelbar nach der Bestrahlung mit dem UV-Licht keine photokonvertierten Zellen nachgewiesen werden.

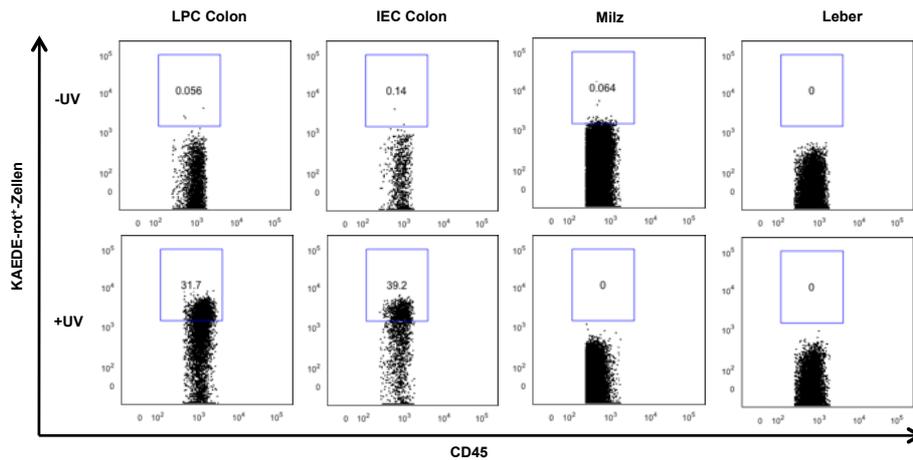


Abbildung 23: Photokonversion von *Kaede* Zellen findet spezifisch im Kolon statt. *Kaede* Mäuse wurden endoskopisch über 3 Minuten mit UV-Licht photokonvertiert, anschließend erfolgte die Zellisolation aus den Zellen der Lamina propria (LPC) im Kolon, intraepitheliale Zellen (IEC) des Kolons, der Milz und der Leber. Dargestellt sich repräsentative FACS-Plots von jeweils einem Versuchstier.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass eine endoskopische Photokonversion spezifisch im Kolon möglich war.

3.3.2 Akute DSS-Kolitis in *Kaede* Mäusen

Um das Migrationsverhalten von Zellen während einer DSS-Kolitis zu studieren, wurden zunächst *Kaede* Mäuse über sieben Tage mit DSS behandelt. Zwei Tage nach Absetzen des DSS, also während des Höhepunkts der Entzündung, erfolgte die endoskopische UV-Lichtexposition. Am zweiten Tag nach der Endoskopie erfolgte die Organentnahme zur zellulären Analyse.

Wie in der Abbildung 24 dargestellt, konnte zwei Tage nach der Photokonversion eine erhöhte Frequenz an KAEDE-rot⁺ Zellen in den Lebern von mit DSS-behandelten *Kaede* Mäusen nachgewiesen werden. Wie zu erwarten, waren erhöhte Frequenzen an CD45⁺ Zellen unter inflammatorischen Bedingungen im Kolon nachzuweisen, was auch den höheren Anteil an photokonvertierten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen erklärt. Die positiven Events in den Organen der nicht exponierten Zellen sind als Hintergrundsignal zu werten.

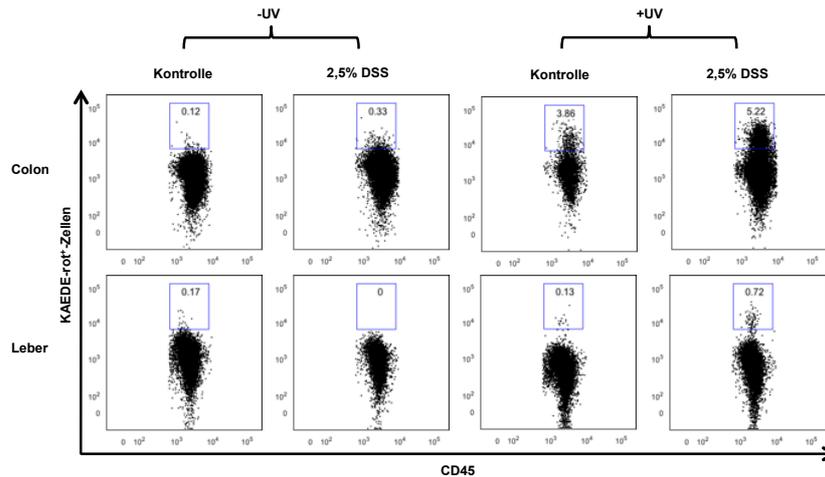


Abbildung 24: Repräsentative FACS-Plots von KAEDE-rot⁺, CD45⁺ Zellen aus Kolon und Leber nach einer akuten DSS-Kolitis. Die Tiere wurden zunächst über einen Zeitraum von sieben Tagen mit 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser behandelt. Zwei Tage nach Absetzen des DSS erfolgte die endoskopische UV-Photokonversion. Zwei Tage später erfolgte die Organentnahme zur zellulären Analyse.

Bei der weiteren Analyse der Zellen, die aus dem Kolon kommend die Leber infiltrierten, zeigte sich, dass die KAEDE-rot⁺ Zellen überwiegend den Oberflächenmarker B220 trugen (Abbildung 25). Bei dieser Zellpopulation handelte es sich somit vorwiegend um B-Zellen. Dagegen zeigte sich, dass die anderen hämatopoetischen Zellen, wie granulozytäre- oder CD4⁺ Zellen überwiegend KAEDE-rot⁻ waren und somit zumindest nicht aus den distalen 4 cm des Kolons stammten.

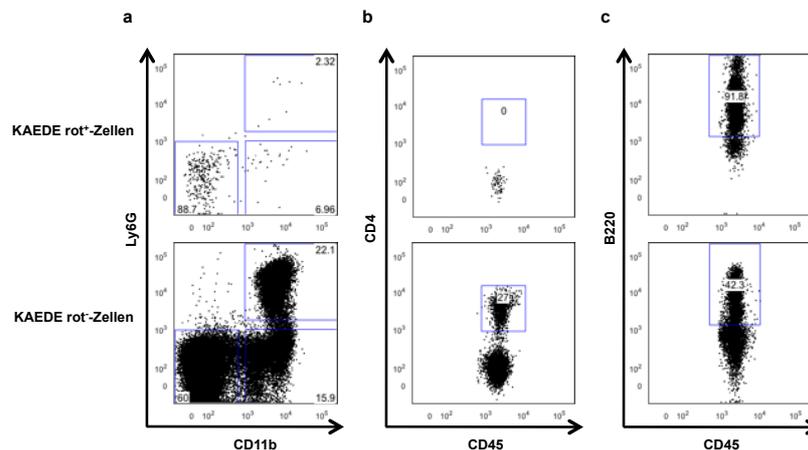


Abbildung 25: Während einer akuten DSS-Kolitis migrieren vor allem B-Zellen aus dem Darm in die Leber. Die Tiere wurden zunächst über einen Zeitraum von sieben Tagen mit 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser behandelt. Zwei Tage nach absetzen des DSS erfolgte die endoskopische UV-Photokonversion. Zwei Tage später wurden die Organe zur zellulären Analyse entnommen. Die Abbildungen zeigen repräsentative FACS-Plots. a) granulozytäre Zellen in der Leber; b) CD4⁺ T-Zellen in der Leber; c) B220⁺ Zellen in der Leber.

Zusammenfassend zeigten diese Experimente, dass zum einen Leukozyten direkt aus dem Kolon in die Leber migrieren. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass es sich bei den migrierenden Zellen im Rahmen einer Dickdarmentzündung vor allem um Zellen des adaptiven Immunsystems handelte.

3.3.3 T-Zell-abhängige Kolitis

Wie bereits für die Transfer-Kolitis mit *in vitro* differenzierten T_H17 Zellen in lymphopenen Mäusen gezeigt, führte die auf diese Weise induzierte Dickdarmentzündung zu einer Infiltration von T-Zellen in die Leber. Um genauer ergründen zu können, ob diese Zellen direkt aus dem Kolon in die Leber einwandern, wurden zum einen naive (CD4⁺ CD44⁻ CD25⁻) und zum anderen die Gesamtheit (CD4⁺ CD44⁺ CD25⁺) der CD4⁺ T-Zellen aus den sekundären lymphatischen Geweben von *Kaede* Mäusen isoliert und anschließend jeweils 10⁵ Zellen *i.p.* in *Rag1*^{-/-} Mäuse gegeben. Zur Beobachtung der Kolitisaktivität wurden die Tiere wöchentlich endoskopiert. Zum Zeitpunkt der höchsten Aktivität erfolgte die endoskopische Photokonversion. Zwei Tage später wurden die Organe zur zellulären Analyse entnommen.

Wie in der Abbildung 26 zu sehen ist, führte eine T-zellabhängige Dickdarmentzündung zu einer direkten Infiltration von T-Zellen aus dem Kolon in die Leber. Anders als bei der DSS-Kolitis waren nun ausschließlich CD4⁺ T-Zellen aus dem entzündeten Darm in die Leber migriert.

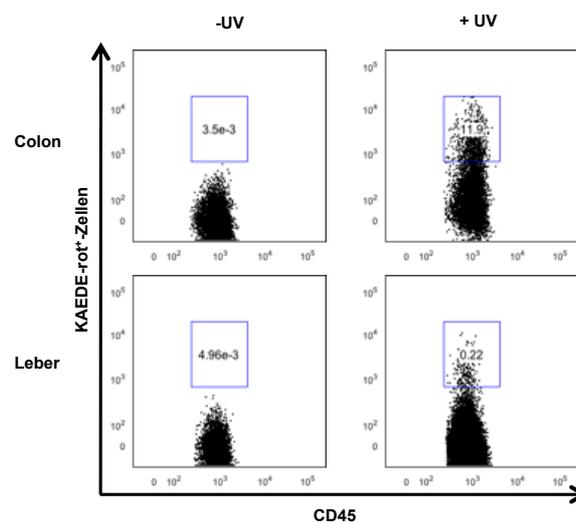


Abbildung 26: Frequenz der KAEDE-rot⁺ Zellen in Kolon und Leber von *Rag1*^{-/-} Mäusen nach Photokonversion von zuvor transferierten naiven KAEDE-grün⁺ CD4⁺ T-Zellen. Die Tiere wurden regelmäßig endoskopiert um die Kolitisaktivität zu überwachen. Zum Zeitpunkt der höchsten Kolitisaktivität erfolgte die endoskopische UV-Photokonversion. Zwei Tage später wurden die Organe zur zellulären Analyse entnommen. Die Abbildungen zeigen repräsentative FACS-Plots.

3.3.4 Akute DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-} Mäusen nach der Transplantation von *Kaede* Knochenmark

Um zu analysieren, ob die Migration der Zellen während der Kolitis aus dem Kolon in die Leber von der Anwesenheit einer Lebererkrankung beeinflusst wird, wurde zunächst aus *Kaede* Mäusen isoliertes Knochenmark in letal bestrahlte *Mdr2*^{-/-} Mäuse gegeben und nach einer sechswöchigen Repopulationsphase eine akute DSS-Kolitis in diesen Tieren induziert. Die endoskopische Photokonversion erfolgte am Tag neun der Kolitis. Die Organe wurden zwei Tage später entnommen.

Wie aus der Abbildung 27 zu erkennen ist, führte die Induktion einer akuten DSS-Kolitis auch bei den Knochenmarkschimären zu einer Infiltration von KAEDE-rot⁺, CD45⁺ Zellen in die Leber.

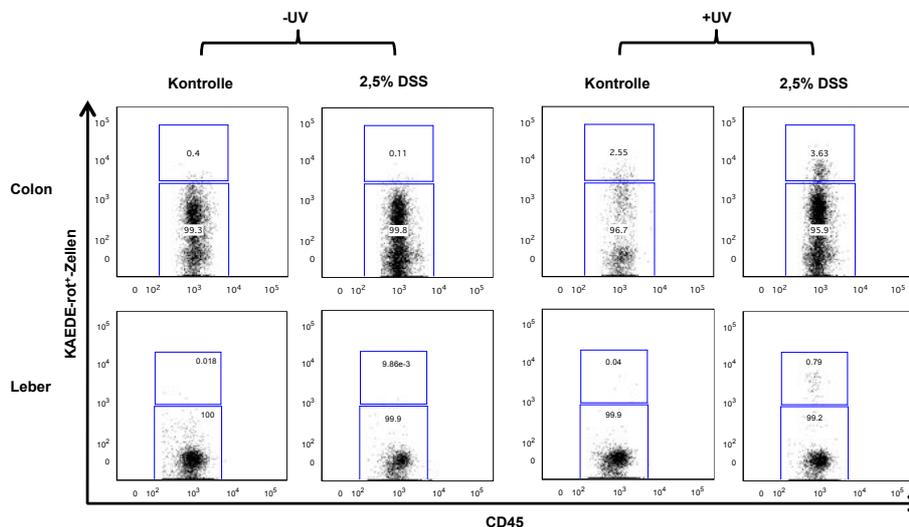


Abbildung 27: Frequenz der KAEDE-rot⁺, CD45⁺ Zellen in Leber und Kolon nach einer akuten DSS-Kolitis bei mit KAEDE Knochenmark repopulierten *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Vier Wochen vor Beginn der DSS-Behandlung wurden die *Mdr2*^{-/-} Mäuse letal mit 9 Gy bestrahlt und mit dem Knochenmark von KAEDE Mäusen rekonstituiert. Als nächstes wurden die Tiere über einen Zeitraum von sieben Tagen mit 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser behandelt. Zwei Tage nach absetzen des DSS erfolgte die endoskopische UV-Photokonversion. Weitere zwei Tage später wurden die Organe zur zellulären Analyse entnommen. Die Abbildungen zeigen repräsentative FACS-Plots.

Bei der näheren Analyse der unterschiedlichen Zellpopulationen (Abbildung 28) zeigte sich, dass eine akute DSS-Kolitis bei genetisch prädisponierten Tieren für eine Primär Sklerosierende Cholangitis zu einer vermehrten Infiltration von B-Zellen aus dem Kolon in die Leber führte. Granulozytäre Zellen, obwohl in erhöhter Frequenz während einer Kolitis in der Leber zu finden, konnten nicht als aus dem Kolon stammend identifiziert werden.

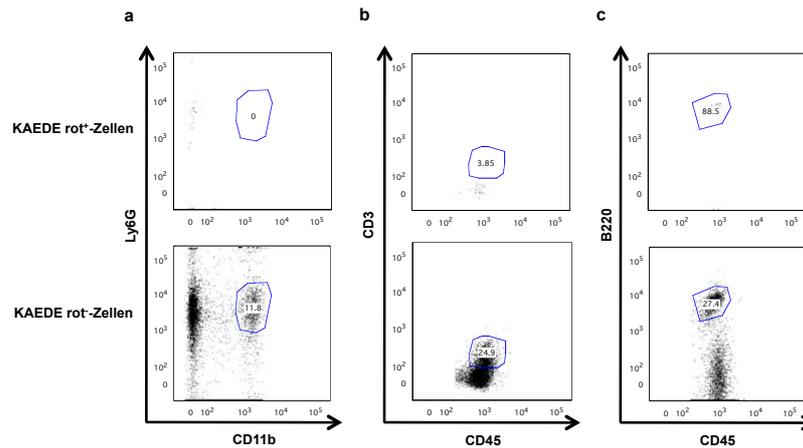


Abbildung 28: Analyse der unterschiedlichen Zellpopulationen der Leber während einer akuten DSS-Kolitis bei mit KAEDE Knochenmark repopulierten *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Vier Wochen vor Beginn der DSS-Behandlung wurden die *Mdr2*^{-/-} Mäuse letal mit 9 Gy bestrahlt und mit dem Knochenmark von *Kaede* Mäusen rekonstituiert. Als nächstes wurden die Tiere über einen Zeitraum von sieben Tagen mit 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser behandelt. Zwei Tage nach Absetzen des DSS erfolgte die endoskopische UV-Photokonversion. Weitere zwei Tage später wurden die Organe zur zellulären Analyse entnommen. Die Abbildungen zeigen repräsentative FACS-Plots. a) granulozytäre Zellen; b) CD3⁺ T-Zellen; c) B220⁺ Zellen.

3.3.5 Chronische DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-} Mäusen nach der Transplantation von *Kaede* Knochenmark

Da eine chronische DSS-Kolitis eher die Eigenschaften der beim Menschen auftretenden Colitis ulcerosa widerspiegelt, sollte in einem weiteren Versuch festgestellt werden, ob bei einer chronischen Entzündung des Dickdarms andere Zellen aus diesem in die Leber einwandern. Wie zuvor beschrieben, erfolgte zunächst die Transplantation von *Kaede* Knochenmark in letal bestrahlte *Mdr2*^{-/-} Mäuse. Nach einer sechswöchigen Repopulationsphase erfolgte die Induktion einer chronischen DSS-Kolitis bei diesen Tieren. Zwei Tage nach Absetzen des letzten DSS-Zyklus erfolgte die endoskopische Photokonversion. Wieder zwei Tage später wurden die Organe der Tiere entnommen und die zelluläre Analyse durchgeführt.

Wie in der Abbildung 29 zu sehen ist, führte auch eine chronische DSS-Kolitis zu einer Infiltration von KAEDE-rot⁺, CD45⁺ Zellen in die Leber. Erwartungsgemäß war dabei die Frequenz dieser Zellen in der Leber bei einer chronischen Dickdarmentzündung im Vergleich zu den unbehandelten Tieren erhöht.

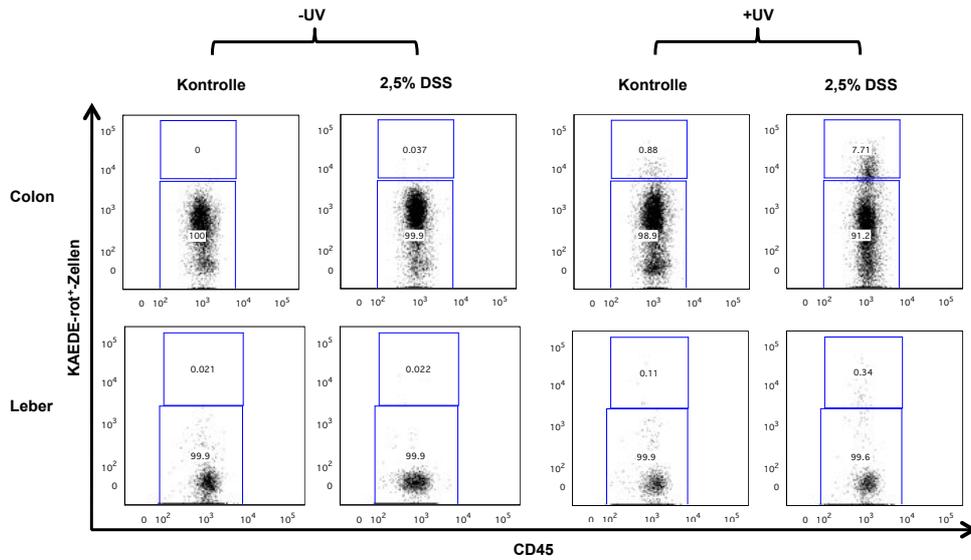


Abbildung 29: Frequenz der KAEDE-rot⁺, CD45⁺ Zellen in Leber und Kolon nach einer chronischen DSS-Kolitis bei mit *Kaede* Knochenmark repopulierten *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Vier Wochen vor Beginn der DSS-Behandlung wurden die *Mdr2*^{-/-} Mäuse letal mit 9 Gy bestrahlt und mit dem Knochenmark von KAEDE-Mäusen rekonstituiert. Anschließend wurde den Tieren in insgesamt drei Zyklen 2,5 % DSS *ad libitium* im Trinkwasser verabreicht, zwischen den Zyklen erhielten sie autoklaviertes Leitungswasser. Zwei Tage nach Absetzen des DSS erfolgte die endoskopische UV-Photokonversion. Weitere zwei Tage später wurden die Organe zur zellulären Analyse entnommen. Die Abbildungen zeigen repräsentative FACS-Plots.

Bei der genaueren Analyse der unterschiedlichen Zellpopulationen, (Abbildung 30) die aus dem Kolon kommend die Leber infiltrierten, zeigte sich, dass auch in diesem Fall überwiegend B-Zellen in die Leber einwanderten. Des Weiteren konnten auch T-Zellen, die zuvor im Dickdarm waren, in den Lebern von chronisch mit DSS-behandelten Tieren nachgewiesen werden.

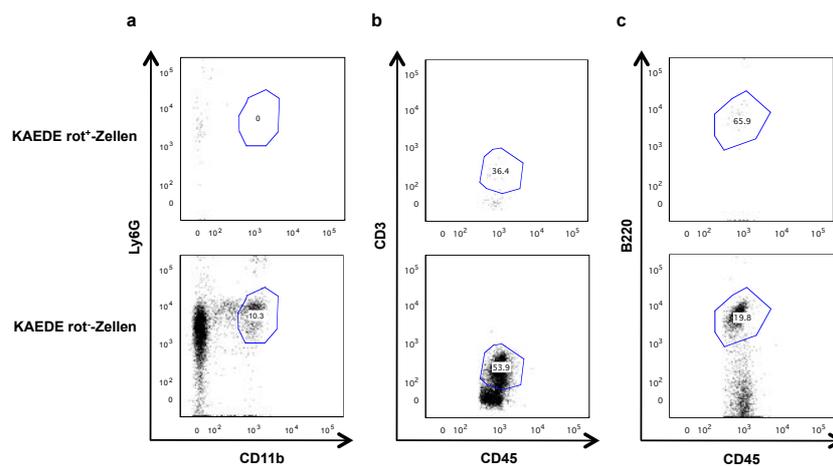


Abbildung 30: Analyse der unterschiedlichen Zellpopulationen der Leber während einer chronischen DSS-Kolitis von mit *Kaede* Knochenmark repopulierten *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Vier Wochen vor Beginn der DSS-Behandlung wurden die *Mdr2*^{-/-} Mäuse letal mit 9 Gy bestrahlt und mit dem Knochenmark von *Kaede* Mäusen rekonstituiert. Anschließend wurde den Tieren in insgesamt drei Zyklen 2,5 % DSS *ad libitium* im Trinkwasser verabreicht, zwischen den Zyklen erhielten sie autoklaviertes Leitungswasser. Zwei Tage nach Absetzen des DSS erfolgte die endoskopische UV-Photokonversion. Weitere zwei Tage später wurden die Organe zur zellulären Analyse entnommen. Die Abbildungen zeigen repräsentative FACS-Plots. a) granulozytäre Zellen; b) CD3⁺ T-Zellen; c) B220⁺ Zellen.

3.4 Der Einfluss T-zellabhängiger Kolitismodelle auf eine PSC-ähnliche Leberpathologie

Wie in den Versuchen mit der DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen gezeigt, führte die chemisch induzierte, unspezifische Entzündung im Darm zwar zu einer Akkumulation von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in der Leber, eine Verschlechterung der Leberpathologie konnte dabei jedoch nicht festgestellt werden. Stattdessen kam es eher zu einer leichten Reduktion der Leberfibrose und einer deutlichen Senkung der Lebertransaminasen. Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob eine T-Zell abhängige Darmentzündung einen Einfluss auf eine bereits zuvor bestehende Leberpathologie haben könnte.

3.4.1 Transferkolitis in *Rag1*^{-/-}*Mdr2*^{-/-} Mäusen

Um den Einfluss eines T-zellabhängigen Kolitismodells auf die Entwicklung einer Leberpathologie untersuchen zu können, wurden zunächst *Mdr2*^{-/-} Mäuse mit *Rag1*^{-/-} Mäusen gekreuzt. Auf diese Weise konnten Mäuse generiert werden, die zwar einen PSC ähnlichen Phänotypen aufwiesen, bei denen jedoch die Zellen des adaptiven Immunsystems fehlten.

Für die Induktion einer T-zellabhängigen Kolitis wurden zunächst naive T-Zellen aus den sekundären lymphatischen Organen (Milz, inguinale, axilläre und zervikale Lymphknoten) von Fir/Singer/IFN γ -Kat Mäusen isoliert und unter speziellen Kulturbedingungen *in vitro* über einen Zeitraum von vier Tagen in T_H17 bzw. T_H1 Zellen differenziert. Im Anschluss wurden die Zellen mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung aus der Kultur isoliert und schließlich in die *Rag1*^{-/-}*Mdr2*^{-/-} Mäusen transferiert. Da der Transfer von *in vitro* differenzierten T_H1 Zellen bei *Rag1*^{-/-} Mäusen zu keiner Dickdarmentzündung führte (siehe 3.1.2), wurde diese T-Zellsubpopulation als Kontrolle gewählt. Die Tiere wurden wöchentlich endoskopiert und regelmäßig gewogen. Die zelluläre Analyse erfolgte zum Zeitpunkt der höchsten Entzündungsaktivität im Dickdarm.

Bei Betrachtung der klinischen Verlaufparameter (Abbildung 31) fällt auf, dass die Tiere bereits 14 Tage nach dem Zelltransfer an Gewicht verloren. Aus endoskopischer Sicht zeigten beide Versuchsgruppen einen eher milden Verlauf der Darmentzündung, der sich jedoch in beiden Gruppen nicht signifikant unterschied. Die Isolation der Leukozyten aus dem Kolongewebe zeigte dagegen eine signifikant erhöhte Anzahl an Leukozyten im Dickdarm der Tiere, die die T_H17 Zellen erhalten hatten. Bei der histopathologischen Untersuchung des Lebergewebes zeigte sich ein in der Tendenz leicht erhöhter Entzündungswert in den Lebern

der Tiere dieser Versuchsgruppe (Abbildung 31e). Bezogen auf die Fibrose waren keine Unterschiede in den beiden Versuchsgruppen zu erkennen. Die Expressionsanalyse profibrotischer Gene in der Leber zeigte lediglich für *Acta2* eine signifikante Erhöhung in der Versuchsgruppe, die T_H17 Zellen erhalten hatte (Abbildung 31h). Auch die Untersuchung der Lebertransaminasen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen (Abbildung 31d).

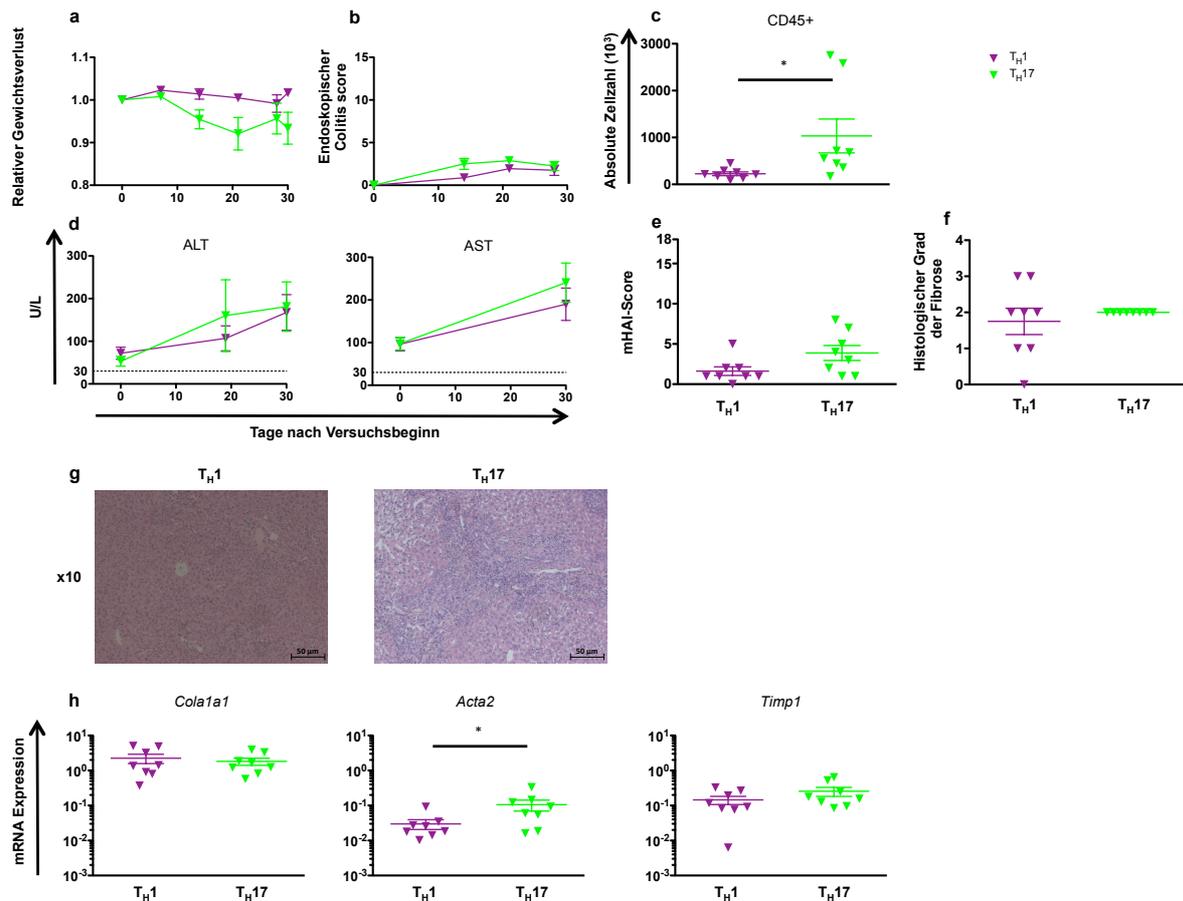


Abbildung 31: Klinische Parameter einer T_H17 Zell abhängigen Kolitis in *Rag1^{-/-}Mdr2^{-/-}* Mäusen. T_H17 und T_H1 Zellen wurden *in vitro* differenzierte und jeweils 10⁵ Zellen in *Rag1^{-/-}Mdr2^{-/-}* Mäusen mittels *i.p.* Injektion transferiert. In jeder Versuchsgruppe befanden sich acht Tiere. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney T-Test. *: p ≤ 0,05. a) relativer Gewichtsverlust; b) Endoskopischer Colitis score; c) Absolute Zellzahl der aus Kolongewebe isolierten Leukozyten; d) Lebertransaminasen aus venösem Blut; e) histopathologische Beurteilung der Entzündungsaktivität in der Leber an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; f) histopathologische Beurteilung der Leberfibrose an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; g) repräsentative, HE-gefärbte histologische Bilder der Leber in 10-facher Vergrößerung; h) Expressionsanalyse profibrotischer Gene *Cola1a1*, *Acta2* und *Timp1* aus Lebergewebe.

Bei der Analyse der CD45⁺ und CD4⁺ Zellen in der Leber konnte kein signifikanter Unterschied in der Frequenz und Anzahl zwischen den Versuchsgruppen beobachtet werden (Abbildung 32). Die Untersuchung der Subpopulationen der CD4⁺ T-Zellen zeigte, dass die Versuchsgruppe, die *in vitro* differenzierte T_H17 Zellen erhalten hatte, tendenziell eine etwas

erhöhte Anzahl an T_H17 und T_H1+T_H17 Zellen in der Leber aufwies. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Um die Plastizität der transferierten Zellpopulation zu analysieren erfolgte auch in diesem Fall die Analyse der regulatorischen T-Zellen und der T_H1 Zellen. Dabei fiel auf, dass in der Leber keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen bestanden (Abbildung 32c).

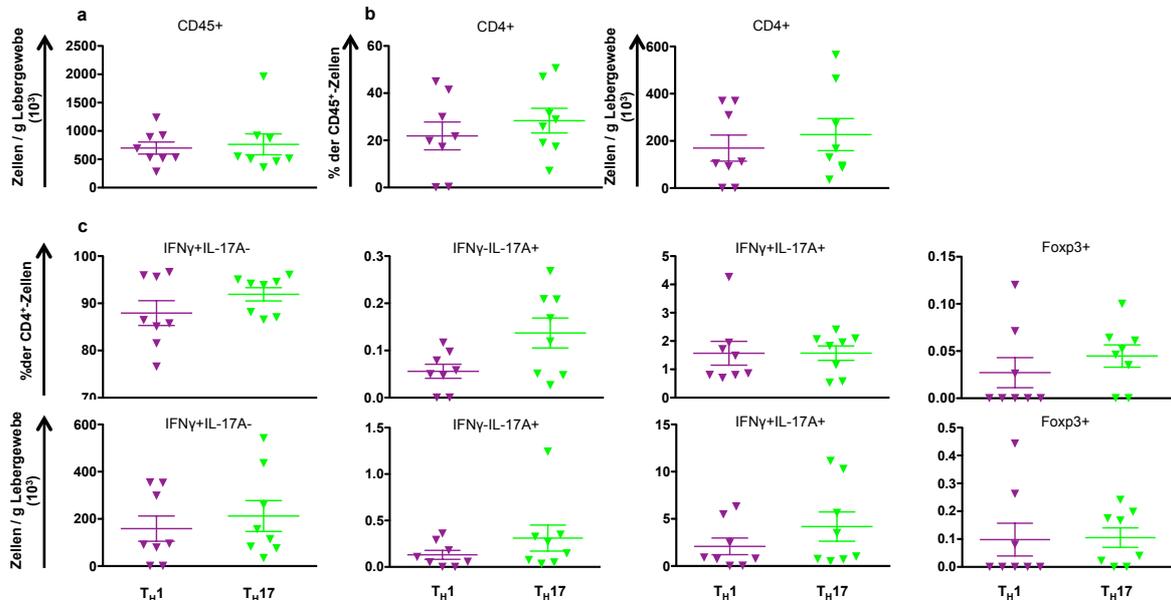


Abbildung 32: Analyse der unterschiedlichen CD4⁺ T-Zellen in der Leber bei einer T_H17 Zell abhängigen Kolitis in *Rag1*^{-/-} *Mdr2*^{-/-} Mäusen. T_H17 und T_H1 Zellen wurden *in vitro* differenzierte und jeweils 10⁵ Zellen in *Rag1*^{-/-} *Mdr2*^{-/-} Mäusen mittels *i.p.* Injektion transferiert. In jeder Versuchsgruppe befanden sich acht Tiere. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney T-Test. a) Absolute Zellzahl der CD45⁺ Zellen; b) Frequenz und absolute Zellzahl der CD4⁺ T-Zellen; c) Frequenz und absolute Zellzahl der IFN γ ⁺, IL-17A⁺, IL-17A⁻ und IFN γ ⁺ doppelt positiven sowie Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen.

Bei Betrachtung der Zellen des angeborenen Immunsystems konnte ebenfalls keine vermehrte Akkumulation von granulozytären und monozytären Zellen in den Lebern der mit T_H17 Zellen behandelten Tiere nachgewiesen werden (Abbildung 33).

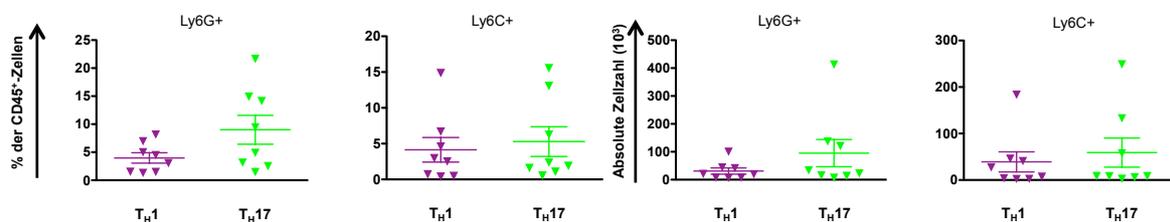


Abbildung 33: Frequenz und absolute Zellzahl der granulozytären und monozytären Zellen in die Leber bei einer T_H17 Zell abhängigen Kolitis in *Rag1*^{-/-} *Mdr2*^{-/-} Mäusen. T_H17 und T_H1 Zellen wurden *in vitro* differenzierte und jeweils 10⁵ Zellen in *Rag1*^{-/-} *Mdr2*^{-/-} Mäusen mittels *i.p.* Injektion transferiert. In jeder Versuchsgruppe befanden sich acht Tiere. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney T-Test.

Während die Expression von *Il6* in der Leber bei beiden Versuchsgruppen keinen Unterschied aufwies, zeigten die Tiere, die die T_H17 Zellen erhalten hatten eine signifikant erhöhte Expression von *Tnfa* (Abbildung 34a). Während die Expression von *Il17a* nicht detektiert werden konnte, zeigten sich für *Ifng* keine signifikanten Unterschiede in beiden Versuchsgruppen (Abbildung 26b).

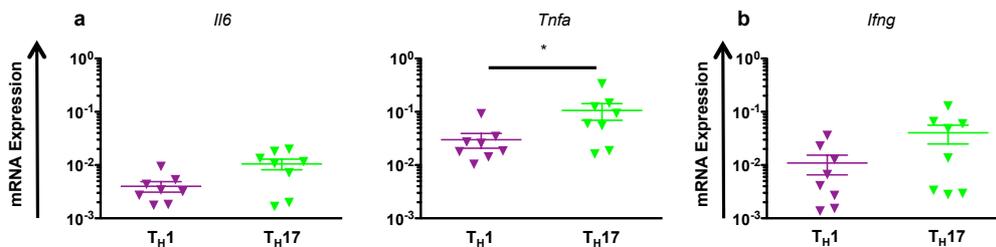


Abbildung 34: Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in der Leber bei einer T_H17 Zell abhängigen Kolitis in *Rag1^{-/-}Mdr2^{-/-}* Mäusen. T_H17 und T_H1 Zellen wurden *in vitro* differenzierte und jeweils 10⁵ Zellen in *Rag1^{-/-}Mdr2^{-/-}* Mäusen mittels *i.p.* Injektion transferiert. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney T-Test. *: $p \leq 0,05$. a) Expression von *Il6* und *Tnfa* in der Leber; b) Expression von *Ifng* in der Leber.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Transfer von T_H17 Zellen in eine lymphopene Empfängermaus mit einer vorbestehenden Leberpathologie zu einem Gewichtsverlust und einer milden Kolitis führte. Diese milde Kolitis hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Leberpathologie. Auch die Zusammensetzung der unterschiedlichen Zellpopulationen in der Leber unterschied sich in diesem Kolitis-Modell nicht signifikant zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen.

3.4.2 *Citrobacter rodentium* Infektion als infektiöses Kolitis-Modell

Wie bereits in der DSS-Kolitis beobachtet, scheinen unter den Zellen des adaptiven Immunsystems, die in die Leber einwandern, insbesondere T_H17 Zellen zu sein. Daher stellte sich die Frage, ob die Leberpathologie in einem alternativen T_H17-zellabhängigen Kolitis-Modell beeinflusst wird. Aus diesem Grund erfolgte die Induktion einer *Citrobacter rodentium* Infektion, bei der durch die Generation von T_H17 Zellen eine Protektion für den Wirt ausgeht [60, 83].

Um eine *Citrobacter*-Infektion zu induzieren, wurden die *Mdr2^{-/-}* Mäuse mit 10⁹ CFU *Citrobacter rodentium* inokuliert und nach sieben Tagen Inkubationszeit die Organe zur zellulären Analyse entnommen. Als Kontrolle erfolgte die Applikation von PBS.

Resultate

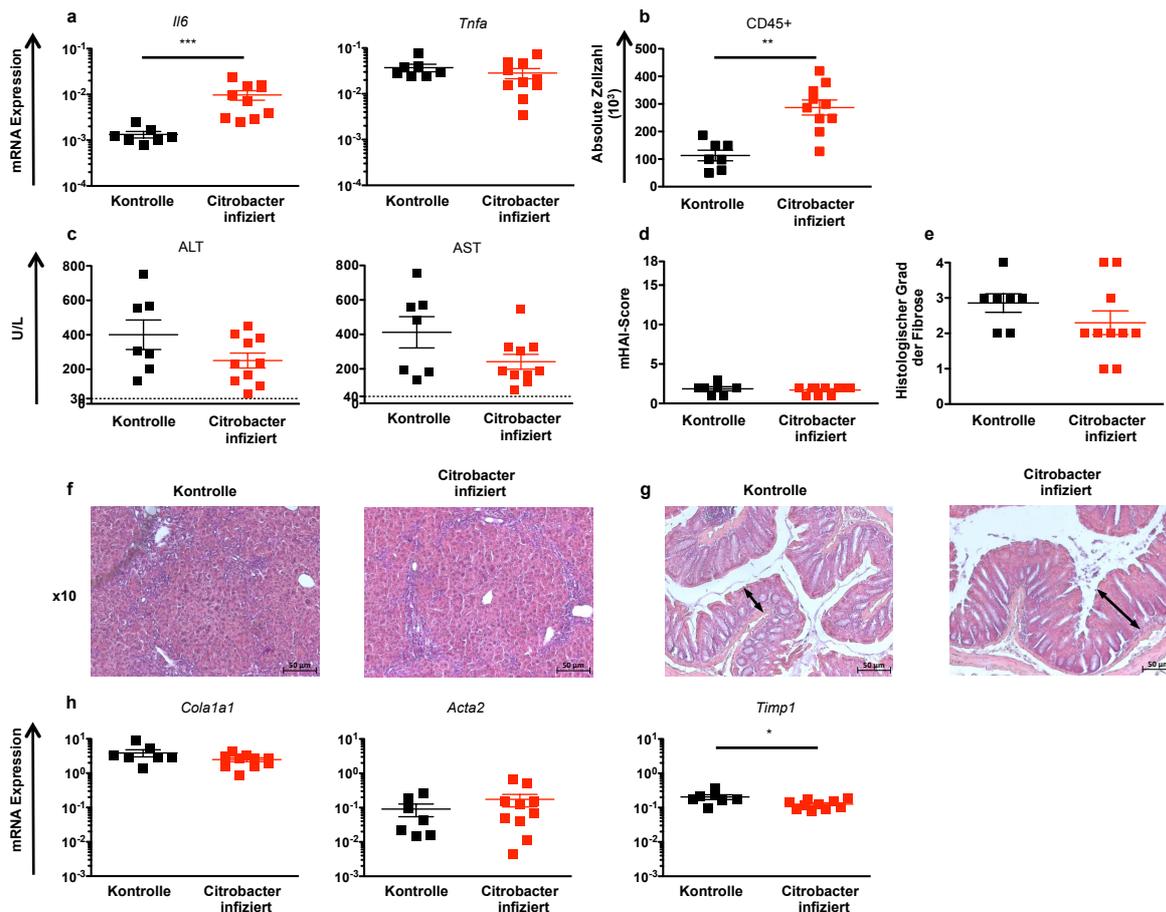


Abbildung 35: Klinische bei einer *Citrobacter rodentium* Infektion in *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Die Tiere wurden mit 200 μ l einer Bakteriensuspension inokuliert (10^9 CFU) und sieben Tage später analysiert. Für die Kontrollgruppe wurden 6, für die Behandlungsgruppe 10 Tiere verwendet. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. Dargestellt ist jeweils der arithmetische Mittelwert sowie der SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney T-Test. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$. a) Expressionsanalyse der proinflammatorischen Cytokine *Il6* und *Tnfa* aus Kolongewebe; b) Absolute Zellzahl der aus Kolongewebe isolierten Leukozyten; c) Lebertransaminasen aus venösem Blut; d) histopathologische Beurteilung der Entzündungsaktivität in der Leber an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; e) histopathologische Beurteilung der Leberfibrose an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; f) repräsentative, HE-gefärbte histologische Bilder der Leber in 10-facher Vergrößerung; g) repräsentative, HE-gefärbte histologische Bilder des Kolons in 10-facher, die Pfeile verdeutlichen die Hyperplasie der Kolonschleimhaut während einer Infektion mit *Citrobacter rodentium*; h) Expressionsanalyse pro-fibrotischer Gene *Cola1a1*, *Acta2* und *Timp1* aus Lebergewebe.

Wie aus der Abbildung 35a zu entnehmen ist, zeigte die mit *Citrobacter rodentium* infizierte Versuchsgruppe eine signifikant erhöhte Expression von *Il6* im Kolongewebe während die Expression von *Tnfa* zwischen beiden Versuchsgruppen keinen Unterschied aufwies. Als zusätzlicher Indikator einer Entzündung konnte eine signifikant erhöhte Anzahl an Leukozyten aus dem Kolongewebe isoliert werden (Abbildung 35b). Wie in den repräsentativen HE-gefärbten histologischen Bildern des Kolons dargestellt, kam es als Zeichen der Entzündung bei den infizierten Tieren zu einer Hyperplasie der Darmschleimhaut (Pfeile Abbildung 35g). Die histopathologische Beurteilung der Entzündungsaktivität, sowie die Beurteilung der Fibrose ergaben keine Unterschiede in beiden Versuchsgruppen

(Abbildung 35d-f). Die Bestimmung der Lebertransaminasen zeigte in der Tendenz leicht erniedrigte Werte bei der infizierten Versuchsgruppe (Abbildung 35c), der Unterschied zwischen beiden Gruppen war jedoch nicht signifikant. Bei der Analyse der pro-fibrotischen Gene in der Leber zeigte sich lediglich für *Timp1* eine signifikante Reduktion im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abbildung 35h).

Die zelluläre Analyse der T-Zellen in der Leber zeigte, dass insbesondere T_H17 und T_H1+T_H17 -Zellen in den Lebern infizierter Tiere akkumulierten. Bei den T_H1 , T_{reg} , granulozytären und monozytären Zellen in der Leber konnte kein Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen festgestellt werden (Abbildung 36 und 37).

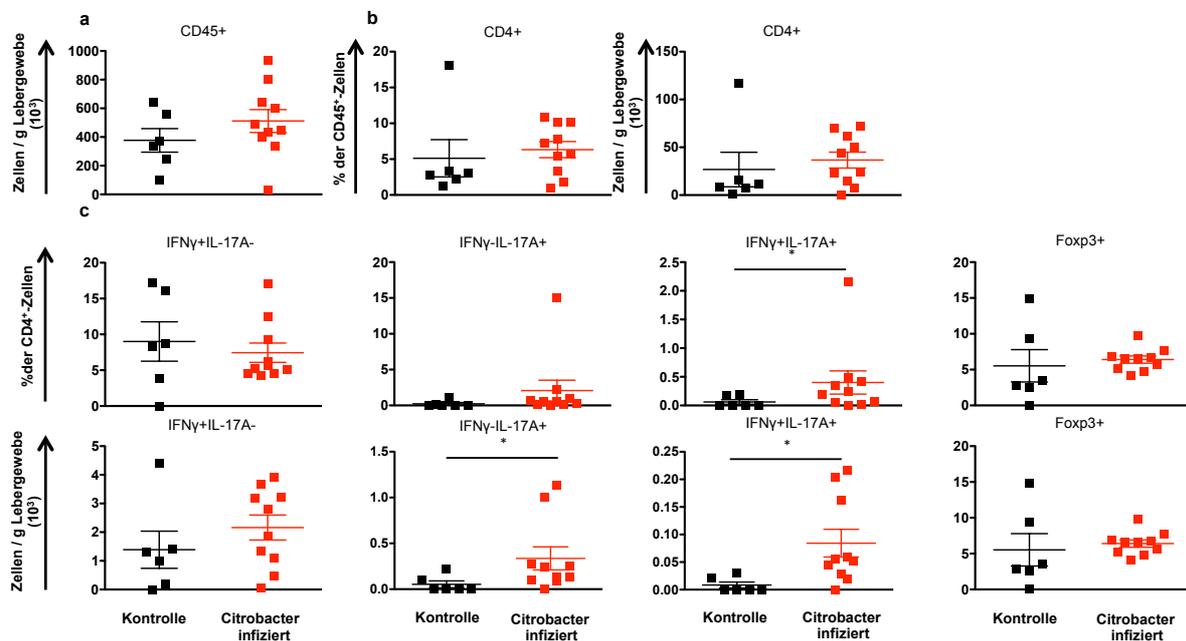


Abbildung 36: Analyse der unterschiedlichen $CD4^+$ T-Zellen in der Leber bei einer *Citrobacter rodentium* Infektion in *Mdr2^{-/-}* Mäusen. Die Tiere wurden mit 200 μ l einer Bakteriensuspension inokuliert (10^9 CFU) und sieben Tage später analysiert. Für die Kontrollgruppe wurden 6, für die Behandlungsgruppe 10 Tiere verwendet. Dargestellt ist jeweils der arithmetische Mittelwert sowie der SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney T-Test. *: $p \leq 0,05$. a) Absolute Zellzahl der $CD45^+$ Zellen; b) Frequenz und absolute Zellzahl der $CD4^+$ T-Zellen; c) Frequenz und absolute Zellzahl der $IFN\gamma^+$, $IL-17A^+$, $IL-17A^+$ und $IFN\gamma^+$ doppelt positiven sowie $Foxp3^+$ $CD4^+$ T-Zellen.

Die Analyse der Expression der pro-inflammatorischen Zytokine *Il6* und *Tnfa* in der Leber zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen (Abbildung 38a). Während bei der Kontrollgruppe nur bei einer von sieben Mäusen die Expression von *Il17a* in der Leber detektiert werden konnte, war dies bei sieben von zehn infizierten Tieren der Fall. Bei der Expressionsanalyse von *Ifng* zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen (Abbildung 38b).

Resultate

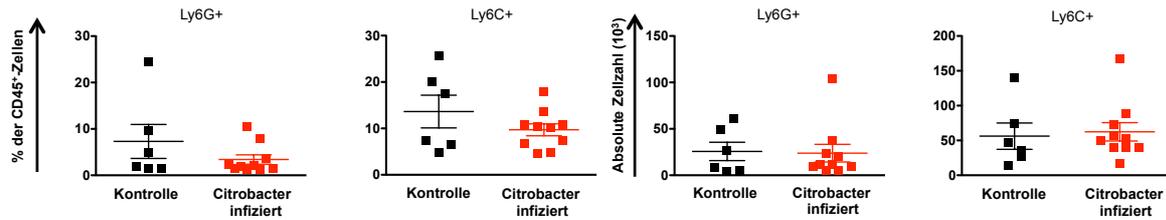


Abbildung 37: Frequenz und absolute Zellzahl der granulozytären und monozytären Zellen in die Leber bei einer *Citrobacter rodentium* Infektion in *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Die Tiere wurden mit 200 µl einer Bakteriensuspension inokuliert (10^9 CFU) und sieben Tage später analysiert. Für die Kontrollgruppe wurden 6, für die Behandlungsgruppe 10 Tiere verwendet. Dargestellt ist jeweils der arithmetische Mittelwert sowie der SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney T-Test.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass weder der Transfer von *in vitro* differenzierten T_{H1} und T_{H17} Zellen in einen lymphopenen Wirt, noch die durch die *Citrobacter*-Infektion generierten T_{H17} Zellen einen negativen Einfluss auf eine bereits existierende Leberpathologie in *Mdr2*^{-/-} Mäusen hatten.

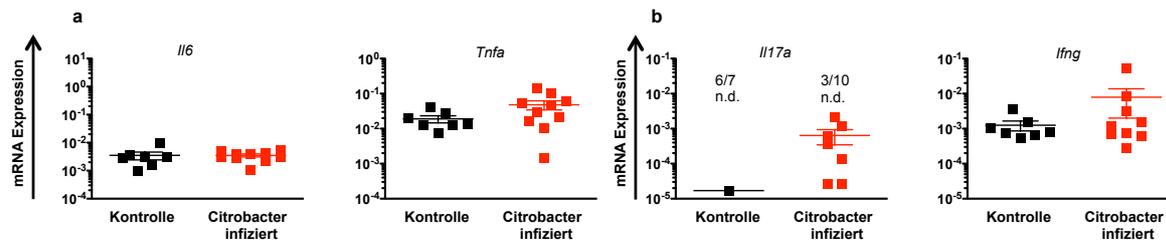


Abbildung 38: Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in der Leber bei einer *Citrobacter rodentium* Infektion in *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Die Tiere wurden mit 200 µl einer Bakteriensuspension inokuliert (10^9 CFU) und sieben Tage später analysiert. Für die Kontrollgruppe wurden 6, für die Behandlungsgruppe 10 Tiere verwendet. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM, die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney T-Test. n.d.: nicht detektiert. a) Expression von *Il6* und *Tnfa* in der Leber; b) Expression von *Il17a* und *Ifng* in der Leber.

3.5 Einfluss des angeborenen Immunsystems auf die Leberpathologie während einer Kolitis

Vorangegangene Experimente mit T_H1 und T_H17 Zellen deuten darauf hin, dass die Zellen des adaptiven Immunsystems die während der DSS-Kolitis beobachtete Verbesserung der Leberpathologie nicht fördern. Aus diesem Grund sollte nun eingehender untersucht werden, welchen Einfluss die Kolitis auf die Leberpathologie in Abwesenheit von CD4⁺ T-Zellen bzw. des gesamten adaptiven Immunsystems hat.

3.5.1 Depletion von CD4⁺ Zellen mittels monoklonalem Anti-CD4-Antikörper in *Mdr2*^{-/-} Mäusen während einer chronischen DSS-Kolitis

Wie bereits für die akute und chronische DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen weiter oben beschrieben, kam es während einer Entzündung im Kolon zu einer vermehrten Infiltration von CD4⁺ T-Zellen in die Leber. Um festzustellen, ob diese Zellpopulation an der Pathogenese des PSC-ähnlichen Phänotyps in *Mdr2*^{-/-} Mäusen beteiligt war oder die Leberpathologie während einer chronischen DSS-Kolitis negativ von diesen Zellen beeinflusst wurde, sollten im nächsten Schritt CD4⁺ Zellen mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen depletiert und zusätzlich eine chronische DSS-Kolitis induziert werden. Für die Depletion wurde sieben Tage vor Beginn der DSS-Behandlung 250 µg des Anti-CD4⁺-Antikörpers intraperitoneal injiziert. Die Gabe wurde bis zum Ende des Experiments alle sieben Tage wiederholt. Als Kontrolle dienten PBS-behandelte Tiere. Die Organentnahme zur zellulären Analyse erfolgte zwei Tage nach dem Absetzen des DSS.

Wie aus der Abbildung 39 zu entnehmen ist, zeigten die Tiere, bei denen die Zelldepletion erfolgte einen ähnlich starken Gewichtsverlust wie die PBS-behandelten Tiere. Auffällig war dagegen, dass diese Mäuse sich deutlich langsamer von der Kolitis erholten. Bei der Analyse des Kolitis Score zum Ende des Versuchs, konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Kolutisausprägung zwischen den Versuchsgruppen nachgewiesen werden (Abbildung 39b). Für die Länge des Kolons konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kolutisgruppen festgestellt werden (Abbildung 39c). Die Analyse der Leukozytenzahl ergab zwar nach Induktion der Kolitis eine vermehrte Anzahl an Leukozyten, zwischen den Gruppen, die PBS bzw. den Anti-CD4-Antikörper erhalten hatten, bestanden jedoch keine Unterschiede (Abbildung 39d). Bei der Analyse der Lebertransaminasen zeigte sich, dass die Tiere, bei denen die CD4⁺ Zellen depletiert wurden die Transaminasen tendenziell die höchsten Werte aufwiesen. Dem gegenüber führte eine Kolitis zu einer

signifikanten Reduktion der Transaminasen unabhängig davon, ob eine Depletion der CD4⁺ Zellen vorlag oder nicht (Abbildung 39e). Die histopathologische Beurteilung des Lebergewebes ergab bei den untersuchten Gruppe keinen signifikanten Unterschied im Grad der Leberentzündung und der Ausprägung der Leberfibrose (Abbildung 39f, g+i). Bei der Analyse der Expression der pro-fibrotischen Gene *Cola1a1*, *Acta2* und *Timp1* in der Leber ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nachweisen (Abbildung 39h).

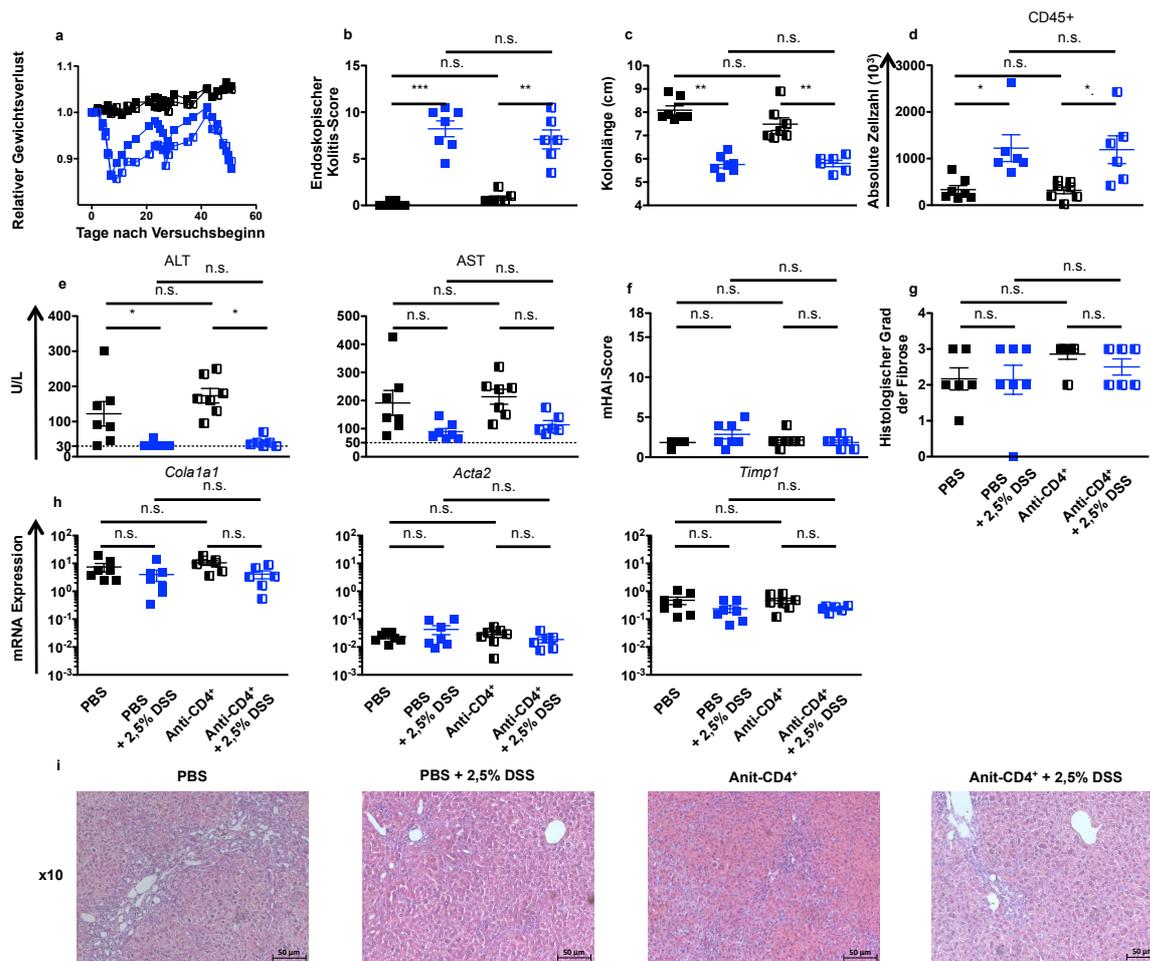


Abbildung 39: Klinische Parameter bei einer chronischen DSS-Kolitis mit Depletion von CD4⁺ Zellen in *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Die Depletion wurde sieben Tage vor Beginn der DSS-Behandlung begonnen und bis zum Ende des Experiments alles sieben Tage wiederholt. Bei jeder Applikation wurden 250 µg des Anti-CD4⁺-Antikörpers intraperitoneal verabreicht. Jedes in den Abbildungen dargestellte Symbol repräsentiert ein Versuchstier. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. Dargestellt sind jeweils der arithmetische Mittelwert sowie der SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,001, n.s.: nicht signifikant. a) relativer Gewichtsverlust; b) Endoskopischer Kolitis score; c) Kolonlänge; d) Absolute Zellzahl der aus Kolongewebe isolierten Leukozyten; e) Lebertransaminasen aus venösem Blut; f) histopathologische Beurteilung der Entzündungsaktivität in der Leber an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; g) histopathologische Beurteilung der Leberfibrose an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; h) Expressionsanalyse profibrotischer Gene *Cola1a1*, *Acta2* und *Timp1* aus Lebergewebe; i) repräsentative, HE-gefärbte histologische Bilder der Leber in 10-facher Vergrößerung.

Bei der zellulären Analyse zeigte sich, dass die Applikation von DSS, wie in den Experimenten zuvor, zu einer tendenziell erhöhten Zahl an hämatopoetischen Zellen in der

Leber führte (Abbildung 40). Erwartungsgemäß war die Frequenz der CD4⁺ Zellen in der mit dem Antikörper behandelten Gruppe erniedrigt. Bei der Analyse der Subpopulationen der CD4⁺ T-Zellen zeigte sich, dass auch in diesem Fall die Zellzahlen für TH1, TH17, TH1+TH17 und regulatorische T-Zellen in der Gruppe, die den Antikörper erhalten hatte im Vergleich zu der DSS-behandelten Kontrollgruppe reduziert waren. Allerdings waren die Zellzahlen in den Versuchsgruppen, die das DSS erhalten hatten gegenüber den unbehandelten Gruppen deutlich erhöht.

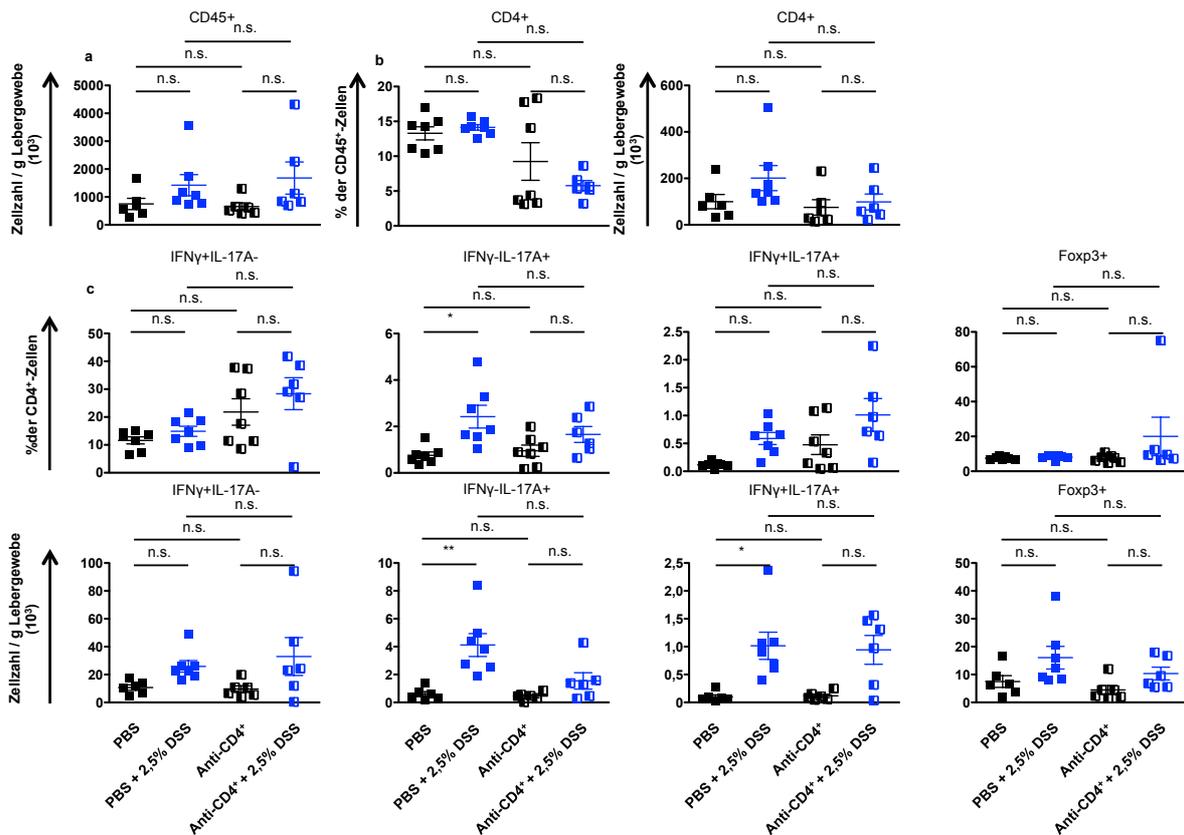


Abbildung 40: Analyse der unterschiedlichen CD4⁺ T-Zellen in der Leber am Ende einer chronischen DSS-Kolitis mit Depletion von CD4⁺ Zellen bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Die Depletion wurde sieben Tage vor Beginn der DSS-Behandlung begonnen und bis zum Ende des Experiments alles sieben Tage wiederholt. Bei jeder Applikation wurden 250 µg des Anti-CD4⁺-Antikörpers intraperitoneal verabreicht. Jedes in den Abbildungen dargestellte Symbol repräsentiert ein Versuchstier. Dargestellt sind jeweils der arithmetische Mittelwert sowie der SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01, n.s.: nicht signifikant. a) Absolute Zellzahl der CD45⁺ Zellen; b) Frequenz und absolute Zellzahl der CD4⁺ T-Zellen; c) Frequenz und absolute Zellzahl der IFNγ⁺, IL-17A⁺, IL-17A⁺ und IFNγ⁺ doppelt positiven sowie Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen.

Bei der Untersuchung der Zellen des angeborenen Immunsystems zeigte sich, dass erneut die Tiere, die DSS erhalten hatten, eine erhöhte Frequenz und Anzahl an granulozytären Zellen aufwiesen (Abbildung 41). Ein Unterschied zwischen den beiden mit DSS-behandelten Gruppen bestand dagegen nicht. Auf Grund von technischen Problemen konnte nicht aus allen Leberproben die Frequenz und Anzahl an monozytären Zellen bestimmt werden.

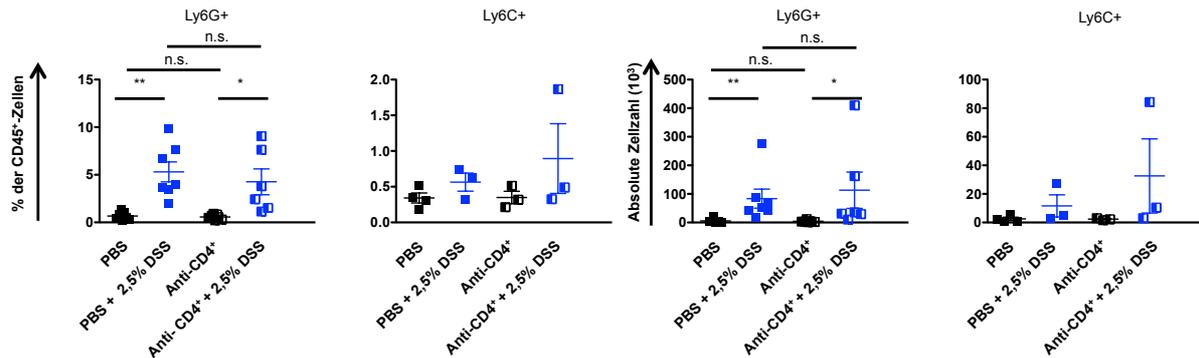


Abbildung 41: Frequenz und absolute Zellzahl der granulozytären und monozytären Zellen in die Leber bei einer chronischen DSS-Kolitis mit Depletion von CD4⁺ Zellen bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Die Depletion wurde sieben Tage vor Beginn der DSS-Behandlung begonnen und bis zum Ende des Experiments alles sieben Tage wiederholt. Bei jeder Applikation wurden 250 µg des Anti-CD4⁺-Antikörpers intraperitoneal verabreicht. Jedes in den Abbildungen dargestellte Symbol repräsentiert ein Versuchstier. Dargestellt sind jeweils der arithmetische Mittelwert sowie der SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$, n.s.: nicht signifikant.

Die Expressionsanalyse von *Il6*, *Tnfa*, *Ifng* und *Il17a* in der Leber konnte keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Versuchsgruppen nachweisen (Abbildung 42).

Zusammenfassend konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass die Depletion/ Teildepletion der CD4⁺ Zellenpopulation die zuvor beobachtete Reduktion der Lebertransaminasen und der Leberfibrose im Rahmen einer DSS-Kolitis nicht signifikant beeinflusste.

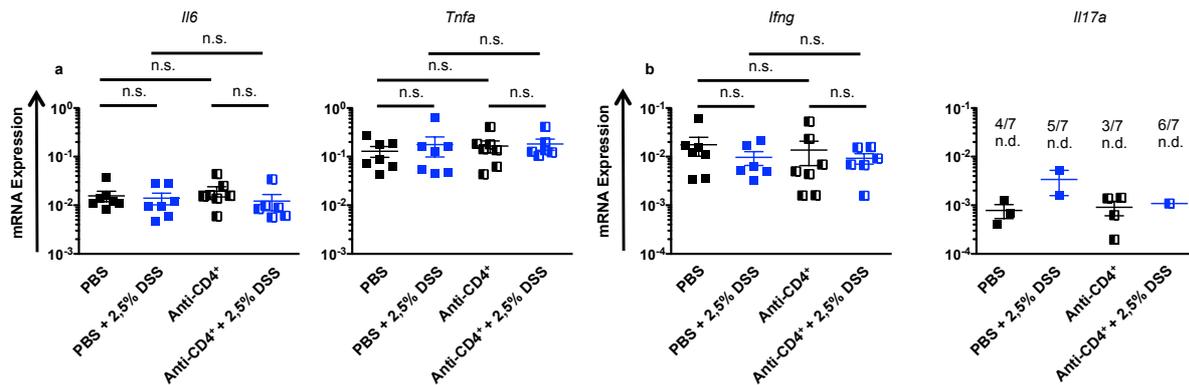


Abbildung 42: Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in der Leber bei einer chronischen DSS-Kolitis mit Depletion von CD4⁺ Zellen bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Die Depletion wurde sieben Tage vor Beginn der DSS-Behandlung begonnen und bis zum Ende des Experiments alles sieben Tage wiederholt. Bei jeder Applikation wurden 250 µg des Anti-CD4⁺-Antikörpers intraperitoneal verabreicht. Jedes in den Abbildungen dargestellte Symbol repräsentiert ein Versuchstier. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM, die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. n.s.: nicht signifikant; n.d.: nicht detektiert. a) Expression von *Il6* und *Tnfa* in der Leber; b) Expression von *Il17a* und *Ifng* in der Leber.

3.5.2 Chronische DSS-Kolitis bei *Rag1*^{-/-}*Mdr2*^{-/-} Mäusen

Wie die zuvor beschriebenen Versuche zeigt, scheinen die CD4⁺ T-Zellen bei dem beobachteten Phänotyp keine Rolle zu spielen, wobei beachtet werden muss, dass hier keine vollständige Depletion der CD4⁺ T-Zellen gelang. Aus diesem Grund wurde als Nächstes die Frage gestellt, ob andere Zellen des adaptiven Immunsystems, wie CD8⁺ T-Zellen oder B-Zellen, eine Rolle bei der beobachteten Protektion während einer DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen spielen könnten. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden 12 Wochen alte *Mdr2*^{-/-} und *Rag1*^{-/-}*Mdr2*^{-/-} Mäuse in alters- und geschlechtsausgeglichenen Gruppen chronisch mit DSS behandelt.

Wie die Abbildung 43 zeigt, konnte bei der Kolitisausprägung weder im Gewichtsverlauf noch im Kolitis Score ein signifikanter Unterschied für die beiden mit DSS-behandelten Versuchsgruppen festgestellt werden. Bei der histopathologischen Analyse der Leber zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bezüglich Entzündungsaktivität und Fibrose. Allerdings ist festzustellen, dass die Leberfibrose in der Tendenz bei den *Mdr2*^{-/-} Mäusen, die DSS erhalten hatten, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen reduziert war. Des Weiteren konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression pro-fibrotischer Gene in der Leber nachgewiesen werden. Interessanterweise waren die Lebertransaminasen bei beiden Kolitisgruppen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen signifikant reduziert.

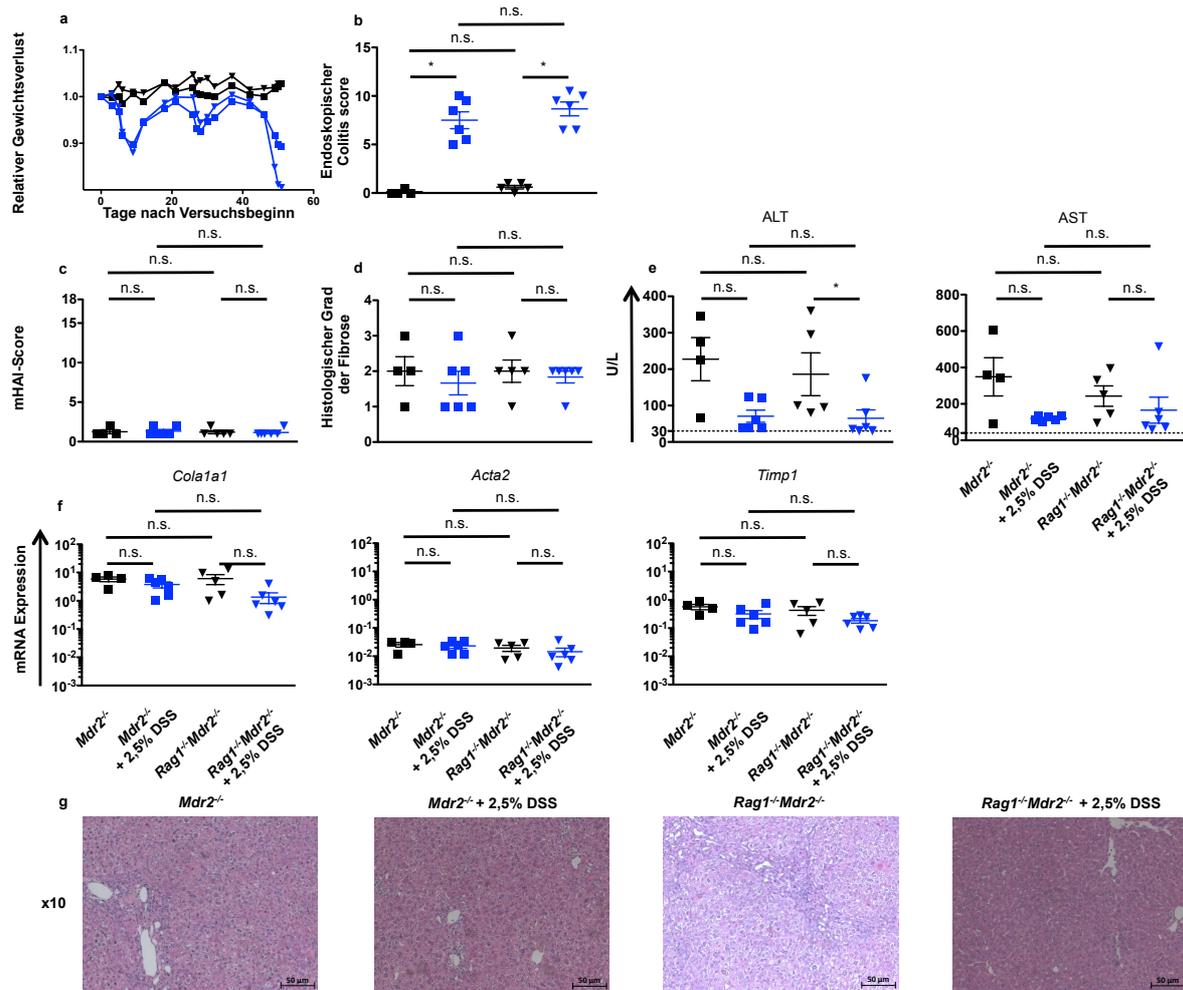


Abbildung 43: Klinische Parameter einer chronischen DSS-Kolitis bei *Rag1^{-/-}Mdr2^{-/-}* Mäusen. Den Tieren wurde in insgesamt drei Zyklen 2,5% DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht, zwischen den Zyklen erhielten sie autoklaviertes Leitungswasser. Jedes in den Abbildungen dargestellte Symbol repräsentiert ein Versuchstier. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n.s.: nicht signifikant. a) relativer Gewichtsverlust; b) Endoskopischer Colitis score; c) histopathologische Beurteilung der Entzündungsaktivität in der Leber an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; d) histopathologische Beurteilung der Leberfibrose an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; e) Lebertransaminasen aus venösem Blut; f) Expressionsanalyse profibrotischer Gene *Col1a1*, *Acta2* und *Timp1* aus Lebergewebe; g) repräsentative, HE-gefärbte histologische Bilder der Leber in 10-facher Vergrößerung.

Bei der zellulären Analyse zeigten die Lebern der DSS-behandelten *Rag1^{-/-}Mdr2^{-/-}* Mäuse die höchste Frequenz und Anzahl an granulozytären und monozytären Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Abbildung 44).

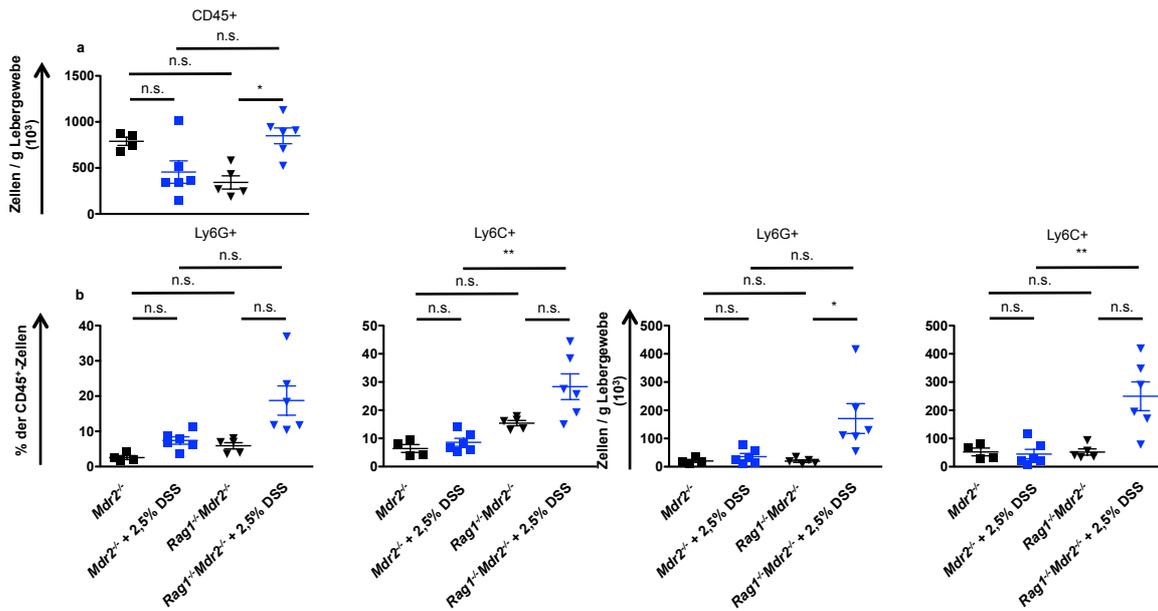


Abbildung 44: Einfluss einer chronischen DSS-Kolitis auf das angeborene Immunsystem in der Leber *Rag1^{-/-}Mdr2^{-/-}* Mäusen. Den Tieren wurde in insgesamt drei Zyklen 2,5% DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht, zwischen den Zyklen erhielten sie autoklaviertes Leitungswasser. Jedes in den Abbildungen dargestellte Symbol repräsentiert ein Versuchstier. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; n.s.: nicht signifikant. a) Absolute Zellzahl der CD45⁺ Zellen b) Frequenz und absolute Zellzahl der granulozytären und monozytären Zellen.

Auch in diesem Fall zeigte die Expressionsanalyse von *Il6*, *Tnfa* und *Ifng* in der Leber keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Versuchsgruppen (Abbildung 45). Die Detektion der Expression des *Il17a* Gens war bei zu geringer Signalstärke nicht möglich.

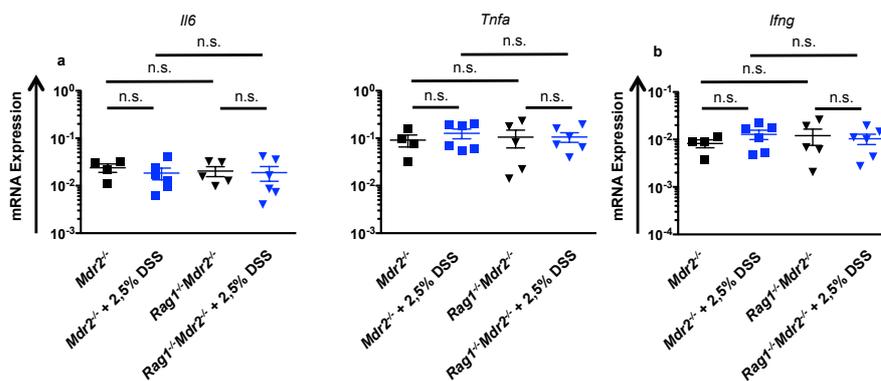


Abbildung 45: Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in der Leber von *Rag1^{-/-}Mdr2^{-/-}* Mäusen bei einer chronischen DSS-Kolitis. Jedes in den Abbildungen dargestellte Symbol repräsentiert ein Versuchstier. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM, die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. n.s.: nicht signifikant. a) Expression von *Il6* und *Tnfa* in der Leber; b) Expression von *Ifng* in der Leber.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Abwesenheit des adaptiven Immunsystems während einer DSS-Kolitis in *Mdr2^{-/-}*-Mäusen keinen Einfluss auf die Reduktion der Lebertransaminasen hatte. Die Leberfibrose zeigte sich während der DSS-Kolitis in Abwesenheit des adaptiven Immunsystems unbeeinflusst.

3.6 Die Rolle der MMP8 in dem beobachteten Phänotyp

Auf der Suche nach einer Erklärung für die reduzierte Fibrose insbesondere bei den 12-14 Wochen alten Tieren und die deutlich erniedrigten Transaminasen bei der DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-} Mäusen, konnte der Literatur entnommen werden, dass die Matrixmetalloproteinase 8 (MMP8) eine erhebliche Rolle als anti-fibrotischer Faktor in der Leber spielt. Interessanterweise exprimieren neben Gallengangsepithelien, Chondrozyten, Endothelzellen und synoviale Fibroblasten insbesondere Granulozyten vermehrt *Mmp8* [84, 85].

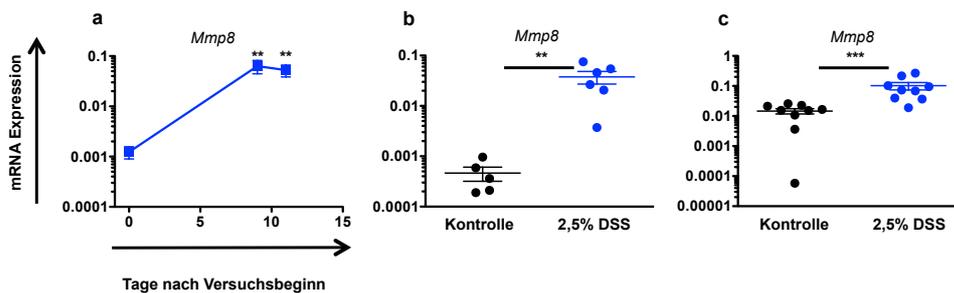


Abbildung 46: Relative Expression des *Mmp8* Gens normalisiert zu *Hprt* im Lebergewebe bei a) einer akuten DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-} Mäusen, einer akuten b) und chronischen c) DSS-Kolitis bei C57Bl6/J-Mäusen. Dargestellt ist jeweils der arithmetische Mittelwert sowie der SEM. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

Um die Rolle der *Mmp8* im Rahmen der DSS-Kolitis zu studieren, wurde zunächst die Expression des *Mmp8* Gens in der Leber mit Hilfe der Real-time Polymerasekettenreaktion analysiert. Wie in der Abbildung 46a für eine akute DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen dargestellt, kam es bereits kurze Zeit nach Induktion einer akuten DSS-Kolitis zu einer erhöhten Expression des *Mmp8* Gens im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Die gleichen Beobachtungen konnten in Wildtypmäusen für die akute und chronische DSS-Kolitis gemacht werden (Abbildung 46b und c).

Um die Rolle der durch hämatopoetische Zellen produzierten MMP8 bei der chronischen DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen zu untersuchen, wurde Knochenmark von *Mmp8*^{-/-} Mäusen oder Wildtyp Mäusen in letal bestrahlte *Mdr2*^{-/-} Mäuse transferiert. Nach einer 8-wöchigen Rekonstitutionsphase erfolgte die Induktion einer chronischen DSS-Kolitis nach dem bekannten Schema. Um die Effektivität der Knochenmarkstransplantation zu testen, wurden Leberproben mit Hilfe der Real-time-PCR-Technologie auf die Expression des *Mmp8* Gens hin untersucht. Wie in der Abbildung 47c dargestellt, zeigten die Tiere, die das Knochenmark der *Mmp8*^{-/-} Mäuse erhalten hatten, sehr geringe Expressionsraten der *Mmp8* in der Leber. Wie zu erwarten, wiesen die Tiere, die das Wildtyp-Knochenmark erhalten hatten nach der DSS-Kolitis eine deutlich erhöhte Expression des *Mmp8* Gens auf.

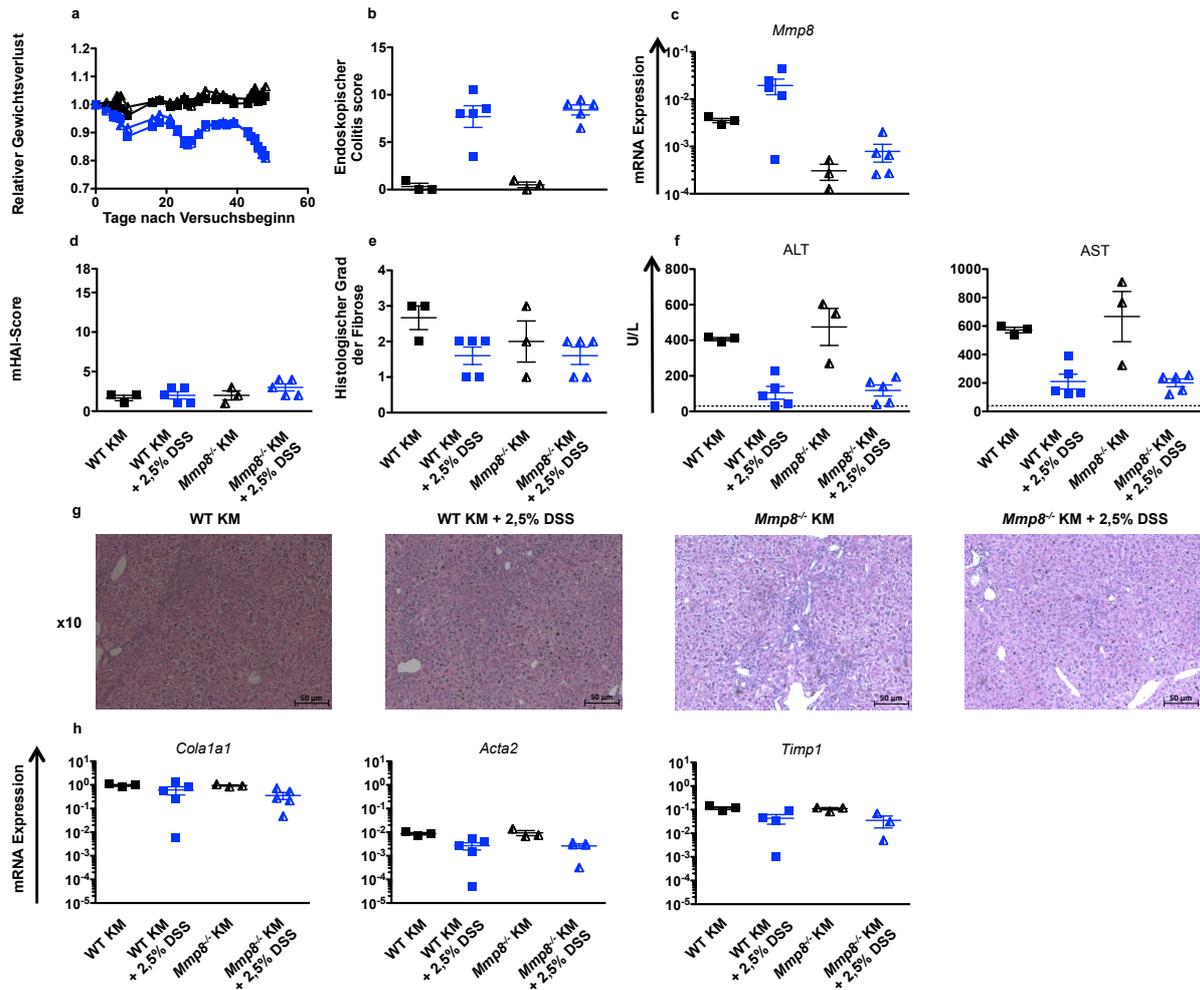


Abbildung 47: Klinische Parameter einer chronischen DSS-Kolitis nach der Transplantation von *Mmp8*^{-/-} oder Wildtyp-Knochenmark in *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Vier Wochen vor Beginn der DSS-Behandlung wurden die Empfängertiere letal mit 9 Gy bestrahlt und mit dem Donorknochenmark rekonstituiert. Anschließend wurde den Tieren in insgesamt drei Zyklen 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht, zwischen den Zyklen erhielten sie autoklaviertes Leitungswasser. Jedes in den Abbildungen dargestellte Symbol repräsentiert ein Versuchstier. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM. Die statistische Auswertung war auf Grund der geringen Gruppegröße nicht möglich. a) relativer Gewichtsverlust; b) endoskopischer Kolitis score; c) relative Expression des *Mmp8* Gens im Lebergewebe; d) histopathologische Beurteilung der Entzündungsaktivität in der Leber an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; e) histopathologische Beurteilung der Leberfibrose an Hand von HE-gefärbten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten; f) Lebertransaminasen aus venösem Blut; g) repräsentative, HE-gefärbte histologische Bilder der Leber in 10-facher Vergrößerung; h) Expressionsanalyse profibrotischer Gene *Col1a1*, *Acta2* und *Timp1* aus Lebergewebe.

Betrachtet man den klinischen Verlauf der DSS-Kolitis, so zeigt sich, dass weder im Gewichtsverlauf, noch im endoskopischen Kolitis Score deutliche Unterschiede zwischen den beiden DSS-behandelten Gruppen bestanden (Abbildung 47a, b). Bei der histologischen Beurteilung der Entzündungsaktivität in der Leber konnten zwischen den vier Versuchsgruppen keine Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 47d). Bei der Betrachtung des Fibrosegrades zeigte sich dagegen, dass die Tiere, die DSS erhalten hatten tendenziell eine verringerte Fibrose aufwiesen. Dabei zeigten die Tiere, die das Wildtyp-Knochenmark erhalten hatten nach der Kolitisinduktion eine deutlichere Reduktion der

Fibrose im Vergleich zu den Tieren, die das Knochenmark der *Mmp8*^{-/-} Mäuse erhielten (Abbildung 39e). Die Analyse pro-fibrotischer Gene in der Leber zeigte keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 47h). Bei der Analyse der Lebertransaminasen fiel erneut auf, dass die DSS behandelten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren deutlich reduzierte Werte aufwiesen (Abbildung 47f). Dabei spielte es offensichtlich keine Rolle, welches Knochenmark die Tiere zuvor erhalten hatten.

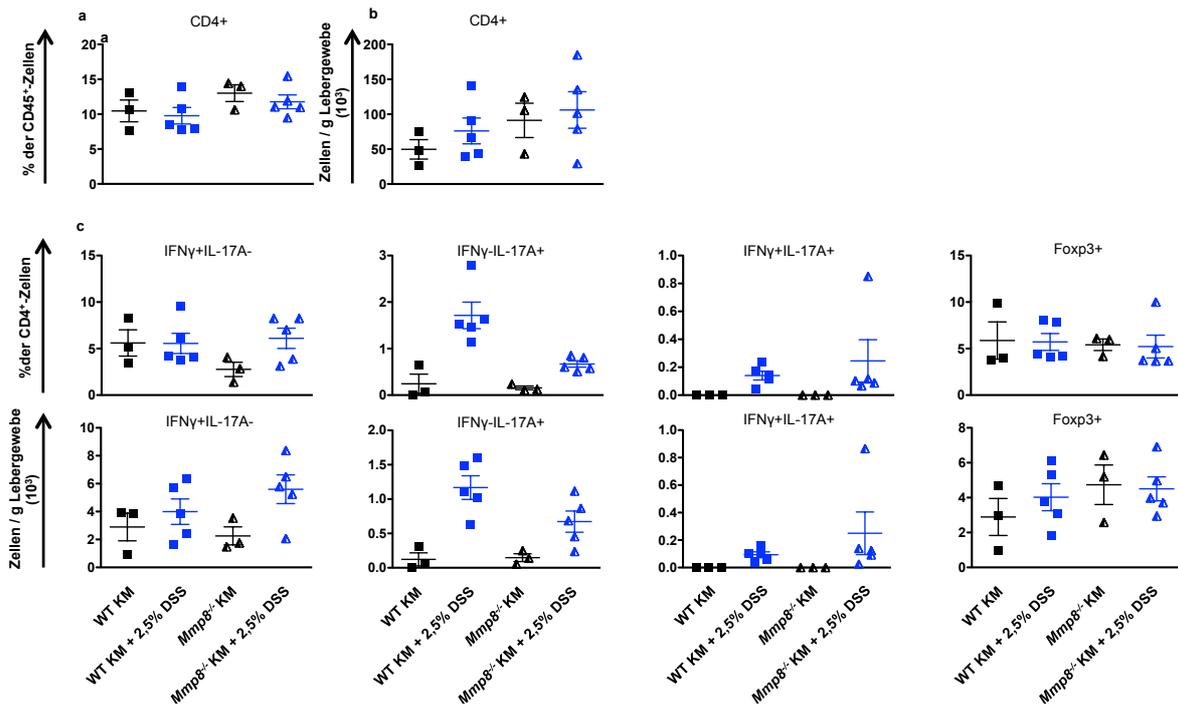


Abbildung 48: T-Zellzusammensetzung in die Leber bei einer chronischen DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen die zuvor eine Knochenmarkstransplantation mit Knochenmark von Wildtyp oder *Mmp8*^{-/-} Mäusen erhalten hatten. Vier Wochen vor Beginn der DSS-Behandlung wurden die Empfängertiere letal mit 9 Gy bestrahlt und mit dem Donorknochenmark rekonstituiert. Anschließend wurde den Tieren in insgesamt drei Zyklen 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht, zwischen den Zyklen erhielten sie autoklaviertes Leitungswasser. Jedes in den Abbildungen dargestellte Symbol repräsentiert ein Versuchstier. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM. Die statistische Auswertung war auf Grund der geringen Gruppengröße nicht möglich. a) Frequenz und b) absolute Zellzahl der CD4⁺ T-Zellen; c) Frequenz und absolute Zellzahl der IFN γ ⁺, IL-17A⁺, IL-17A⁺ und IFN γ ⁺ doppelt positiven sowie Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen.

Bei der Analyse der T-Zellen in der Leber zeigte sich, dass insbesondere bei den Tieren, die das Wildtypknochenmark erhalten hatten und mit DSS behandelt wurden, die Frequenz und Anzahl an T_H17 Zellen im Vergleich zu allen übrigen Versuchsgruppen erhöht war (Abbildung 48). Beide DSS-behandelten Versuchsgruppen wiesen erhöhte Frequenzen und absolute Zellzahlen an T_H1+T_H17 Zellen in der Leber auf. Bei den übrigen untersuchten T-Zellsubpopulationen konnten dagegen keine nennenswerten Unterschiede für die Versuchsgruppen festgestellt werden.

Resultate

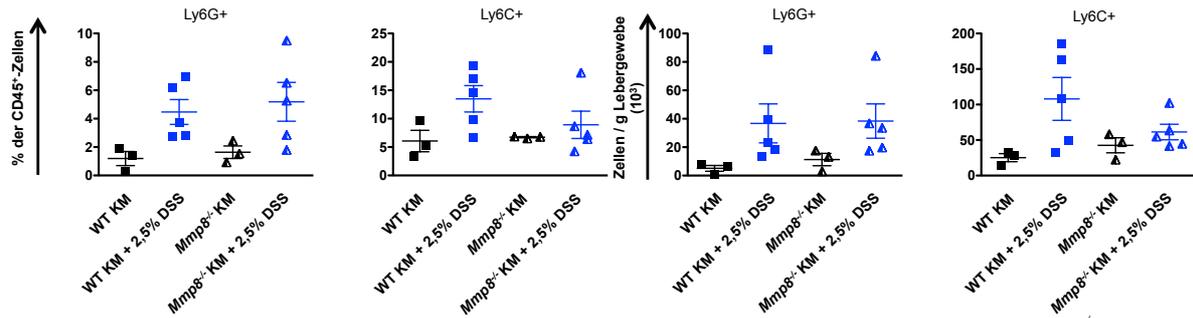


Abbildung 49: Zell des angeborenen Immunsystems in die Leber bei einer chronischen DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen die zuvor eine Konchenmarktransplantation mit Knochenmark von Wildtyp oder *Mmp8*^{-/-} Mäusen erhalten hatten. Vier Wochen vor Beginn der DSS-Behandlung wurden die Empfängertiere letal mit 9 Gy bestrahlt und mit dem Donorknochenmark rekonstituiert. Anschließend wurde den Tieren in insgesamt drei Zyklen 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht, zwischen den Zyklen erhielten sie autoklaviertes Leitungswasser. Jedes in den Abbildungen dargestellte Symbol repräsentiert ein Versuchstier. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM. Die statistische Auswertung war auf Grund der geringen Gruppegröße nicht möglich.

Bei der Analyse der Zellen des angeborenen Immunsystems (Abbildung 49) konnte gezeigt werden, dass bei beiden mit DSS-behandelten Gruppen erhöhte Frequenzen und Zellzahlen an granulozytären Zellen in der Leber zu finden waren. Bei der Betrachtung der monozytären Zellen zeigte sich dagegen, dass zwar bei beiden DSS-Kolitis Gruppen die Frequenzen und Zellzahlen im Vergleich zu den unbehandelten Tieren erhöht waren, jedoch war dieser Effekt bei der Versuchsgruppe, die das *Mmp8*^{-/-} Knochenmark erhalten hatte weniger deutlich ausgeprägt.

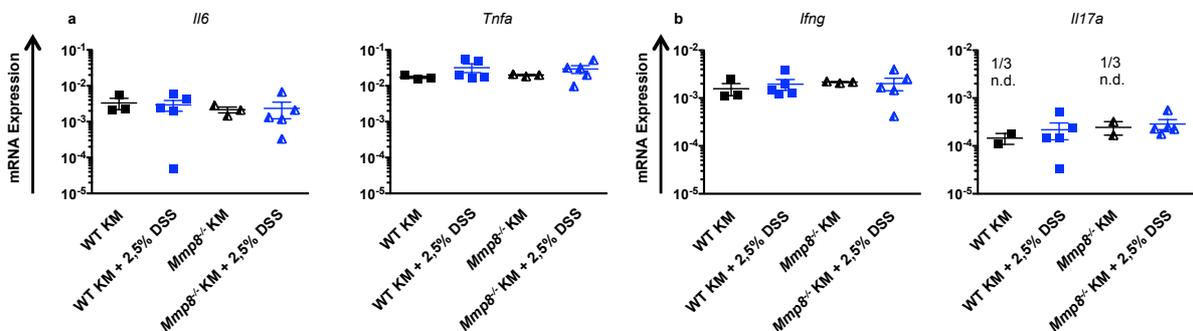


Abbildung 50: Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in der Leber bei einer chronischen DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen die zuvor eine Konchenmarktransplantation mit Knochenmark von Wildtyp oder *Mmp8*^{-/-} Mäusen erhalten hatten. Vier Wochen vor Beginn der DSS-Behandlung wurden die Empfängertiere letal mit 9 Gy bestrahlt und mit dem Donorknochenmark rekonstituiert. Anschließend wurde den Tieren in insgesamt drei Zyklen 2,5 % DSS *ad libitum* im Trinkwasser verabreicht, zwischen den Zyklen erhielten sie autoklaviertes Leitungswasser. Jedes in den Abbildungen dargestellte Symbol repräsentiert ein Versuchstier. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und der SEM, die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. n.s.: nicht signifikant; n.d.: nicht detektiert. a) Expression von *I16* und *Tnfa* in der Leber; b) Expression von *Ifng* und *Il17a* in der Leber.

Die Analyse der Expression der pro-inflammatorischen Gene in der Leber zeigte keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (Abbildung 50). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die hämatopoetische MMP8 Expression im Rahmen der DSS-Kolitis für die erniedrigten Lebertransaminasen der *Mdr2*^{-/-} nicht essentiell zu sein scheint.

Bezüglich der Auswirkung der MMP8 auf die Leberfibrose lässt sich, bei der geringen Mautzahl in diesem Experiment, keine klare Aussage treffen.

3.7 Einfluss einer DSS-Kolitis auf die Gallensäurezusammensetzung bei Wildtyp und *Mdr2*^{-/-} Mäusen

Da der Gallensäuremetabolismus unter anderem auch von der Zusammensetzung des Mikrobioms abhängig ist und dieses wiederum die Kolitisanfälligkeit und die Ausprägung einer Leberpathologie beeinflussen kann, sollte der Einfluss einer DSS-Kolitis auf den Gallensäuremetabolismus bei Wildtyp und *Mdr2*^{-/-} Mäusen untersucht werden.

Zunächst wurde die Änderung der Zusammensetzung der Gallensäuren im Rahmen einer akuten DSS-Kolitis bei Wildtyp Mäusen untersucht. Dafür wurden 12 Wochen alte Wildtyp Mäuse in alters- und geschlechtsausgeglichenen Gruppen über einen Zeitraum von sieben Tagen mit 2,5 % DSS behandelt. Zwei Tage nach Absetzen des DSS mussten die Tiere für vier Stunden fasten. Anschließend wurden die Proben zur Gallensäureanalyse entnommen. Die Analyse erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Heeren vom Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Die Analyse der Gallensäuren in den Lebern von Wildtyp Mäusen (Abbildung 51a links) zeigte, dass die Gesamtmenge der Gallensäuren während einer Kolitis im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen akkumulierte. Vor allem bei den konjugierten Gallensäuren konnten erhöhte Mengen in der Leber gemessen werden. Dabei ist zu beachten, dass die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nur eine Tendenz waren und keine Signifikanz erreichten. Die Analyse des Stuhls (Abbildung 51a rechts) der Tiere zeigte, dass insgesamt der Verlust der Gallensäuren während einer DSS-Kolitis bei Wildtyp Mäusen in der Tendenz reduziert war. Die Menge an sekundären Gallensäuren im Stuhl war während einer akuten DSS-Kolitis signifikant reduziert.

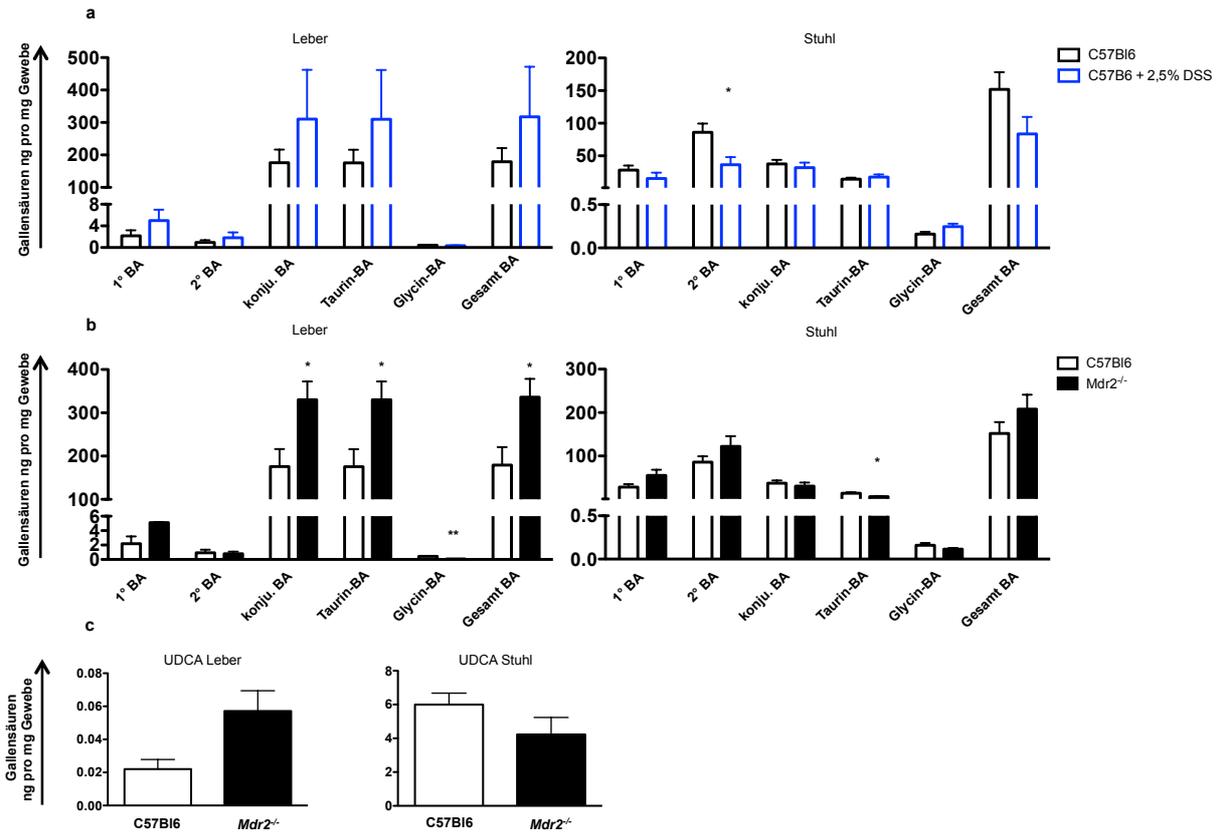


Abbildung 51: Gallensäurezusammensetzung während einer DSS-Kolitis bei Wildtyp Mäusen sowie im Vergleich zwischen Wildtyp Mäusen und *Mdr2*^{-/-} Mäusen a) Gallensäurepool in der Leber (links) und dem Stuhl (rechts) von Wildtyp Mäusen zwei Tage nach einer siebentägigen Behandlung mit 2,5% DSS (n=5) und unbehandelter Kontrollen (n=5). b) Vergleich der Gallensäurezusammensetzung in der Leber und dem Stuhl von C57Bl6/J (n=5)- und *Mdr2*^{-/-} (n=7)-Mäusen. c) UDCA-Menge in den Lebern und dem Stuhl von Wildtyp (n=5) und *Mdr2*^{-/-} (n=7) Mäusen. 1°BA: primäre Gallensäuren; 2°BA: sekundäre Gallensäuren; konju. BA: Gesamtheit der konjugierten Gallensäuren; Taurin-BA: Gesamtheit der Taurin-konjugierten Gallensäuren; Glycin-BA: Gesamtheit der Glycin-konjugierten Gallensäuren; Gesamt BA: Gesamtheit aller Gallensäuren. Dargestellt ist jeweils der arithmetische Mittelwert sowie der SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney T-Test. *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01.

Im nächsten Schritt wurde zunächst die Gallensäurezusammensetzung in der Leber und dem Stuhl von Wildtyp und *Mdr2*^{-/-} Mäusen unter homöostatischen Bedingungen verglichen. Die Analyse zeigte, dass die *Mdr2*^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen insgesamt eine erhöhte Gallensäuremenge in der Leber aufwiesen (Abbildung 51b links). Dabei zeigte sich, dass insbesondere die konjugierten Gallensäuren den Hauptanteil der Gesamtmenge des Gallensäurepools ausmachten. Dabei stellten die Taurin-konjugierten Gallensäuren insgesamt die größte Fraktion dar. Die Analyse des Stuhls zeigte, dass es, abgesehen von einer reduzierten Ausscheidung von Taurin-konjugierten Gallensäuren bei den *Mdr2*^{-/-} Mäusen, keine Unterschiede zwischen den knock-out Tieren und den Wildtypen gab (Abbildung 51b rechts). Zusätzlich wurde die Menge an Ursodeoxycholsäure (UDCA) in der Leber und dem Stuhl analysiert. Diese als cholangio-protektiv geltende Gallensäure zeigte sich bei den *Mdr2*^{-/-} Mäusen in der Tendenz zwar erhöht, ein signifikanter Unterschied zu den Wildtyp Mäusen bestand jedoch nicht.

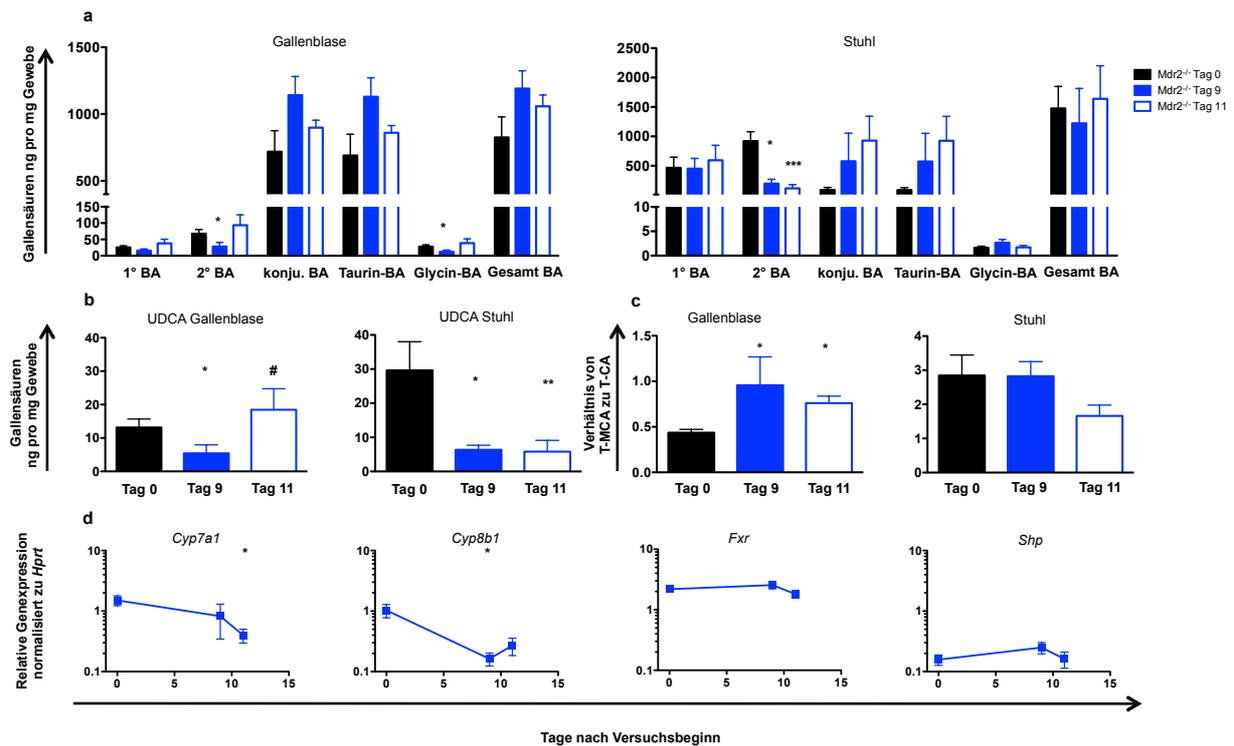


Abbildung 52: Gallensäurezusammensetzung und Expression von Proteinen des Gallensäuremetabolismus während einer DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen. *Mdr2*^{-/-} Mäuse wurden über sieben Tage mit 2,5% DSS behandelt. Unbehandelte Tiere wurden als Kontrolle (Tag 0) genutzt. a) Gallensäurepool in der Galleblase (links) und dem Stuhl (rechts) während einer akuten DSS-Kolitis. b) UDCA-Menge in den Lebern und dem Stuhl von und *Mdr2*^{-/-} Mäusen im Rahmen einer DSS-Kolitis. c) Änderung des Verhältnisses zwischen T-MCA und T-CA während einer akuten Kolitis in der Gallenblase und dem Stuhl. d) Hepatische Expression unterschiedlicher Enzyme die am Gallensäuremetabolismus beteiligt sind, die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert. 1°BA: primäre Gallensäuren; 2°BA: sekundäre Gallensäuren; konju. BA: Gesamtheit der konjugierten Gallensäuren; Taurin-BA: Gesamtheit der Taurin-konjugierten Gallensäuren; Glycin-BA: Gesamtheit der Glycin-konjugierten Gallensäuren; Gesamt BA: Gesamtheit aller Gallensäuren; T-MCA: Tauro-β-Muricholsäure; T-CA: Tauro-Cholsäure. Leber: Tag 0 n = 7, Tag 9 n = 6; Tag 11 n = 7; Stuhl: Tag 0 n = 7, Tag 9 n = 8; Tag 11 n = 7. Dargestellt ist jeweils der arithmetische Mittelwert sowie der SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA. Tag 0 vs. Tag 9/11 *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01; Tag 9 vs. Tag 11 #: p ≤ 0,05.

Als Nächstes stellte sich die Frage, ob sich die Gallensäurezusammensetzung bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen im Rahmen einer akuten DSS-Kolitis ändert. Dafür wurden die *Mdr2*^{-/-} Mäuse wie bereits zuvor beschrieben mit 2,5 % DSS behandelt. Die Organentnahme erfolgte bei Tieren ohne Entzündung (Tag 0) sowie zum Zeitpunkt der stärksten Entzündung (Tag 9) und zu Beginn der Remissionsphase (Tag 11).

Die Analyse der Gallensäurezusammensetzung der Gallenblase (Abbildung 52a links) zeigte, dass auch in diesem Fall in der Tendenz die Gesamtmenge der Gallensäuren während einer Kolitis anstieg. Dabei schienen insbesondere die Taurin-konjugierten Gallensäuren eine Rolle gespielt zu haben. Auffallend war jedoch, dass insbesondere die Menge der Glycin-konjugierten und sekundären Gallensäuren im Rahmen einer DSS-Kolitis signifikant reduziert waren. Die Gallensäureanalyse des Stuhls (Abbildung 52a rechts) zeigte erneut eine in der

Tendenz reduzierte Ausscheidung von Gallensäuren während einer DSS-Kolitis. Interessanterweise war die Ausscheidung sekundärer Gallensäuren im Vergleich zu den unbehandelten Tieren signifikant erniedrigt. Auch in diesem Fall wurde die Menge der UDCA in der Gallenblase und dem Stuhl bestimmt. Interessanterweise fiel diese in der Gallenblase zunächst signifikant ab und konnte zu Beginn der Remissionsphase jedoch in erhöhter Menge gemessen werden. Im Stuhl war diese Gallensäure während der DSS-Kolitis und zu Beginn der Remissionsphase jedoch signifikant reduziert. Da das Verhältnis von Tauro- β -Muricholsäure (T-MCA) zu Tauro-Cholsäure (T-CA) von besonderem Interesse für die Regulation des Gallensäurehaushalts ist, wurde das Verhältnis dieser Gallensäuren für die *Mdr2*^{-/-} Mäuse aus der Gallenblase sowie dem Stuhl während einer DSS-Kolitis bestimmt. Durch die Dickdarmentzündung wurde das Verhältnis zu einem signifikant erhöhten Anteil an T-MCA in der Gallenblase erhöht. Im Stuhl zeigte sich dagegen keine Änderungen dieses Verhältnisses im Verlauf einer Dickdarmentzündung bei den *Mdr2*^{-/-} Mäusen (Abbildung 52c).

Um der Frage nach zu gehen, ob die DSS-Kolitis über die Gallensäuren Einfluss auf die Regulation des Gallensäuremetabolismus ausübt, wurde Lebergewebe auf die Expression einiger Gene hin untersucht (Abbildung 52d). Dabei fiel auf, dass das *Cyp7a1* Gen, welches für das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Gallensäuresynthese codiert, in seiner Expression herunter reguliert war. Die niedrigste Expression wurde dabei an Tag 11 gemessen. Das Gen, welches für *Cyp8b1* codiert, einem wichtigen Enzym zur Synthese der Cholsäure, zeigte dagegen am Tag 9 eine signifikant erniedrigte Expression. Die Gene die für *Fxr* und *Shp* codierten, zwei wichtige regulatorische Proteine des Gallensäurestoffwechsels, waren dagegen durch die DSS-Kolitis unbeeinflusst.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass *Mdr2*^{-/-} Mäuse insgesamt einen größeren Gallensäurepool aufweisen als Wildtyp Mäuse. Dabei scheinen die konjugierten, insbesondere die Taurin-konjugierten, Gallensäuren den größten Anteil zu stellen. Bei der Analyse des Einflusses einer DSS-Kolitis auf den Gallensäurehaushalt fiel auf, dass diese bei den Wildtyp Mäusen nur geringfügige Effekte hatte. Bei den *Mdr2*^{-/-} Mäusen konnte dagegen eine Reduktion der sekundären Gallensäuren sowie erneut eine in der Tendenz erhöhte Menge an Taurin-konjugierten Gallensäuren gemessen werden. Dabei zeigte sich eine Verschiebung des Verhältnisses T-MCA/T-CA hin zu einem erhöhten Anteil an T-MCA. Obwohl die Gene für die regulatorischen Proteine FXR und SHP herabreguliert waren, waren auch die Enzyme des Gallensäuremetabolismus *Cyp7a1* und *Cyp8b1* in ihrer Expression reduziert.

4 Diskussion

Die Pathogenese der Primär Sklerosierenden Cholangitis (PSC) ist unverstanden, jedoch scheinen immunologisch bedingte Schädigungen der Gallengangsepithelien bedeutsam zu sein. Die Mechanismen der periduktalen und portalen Immunregulation sind weitgehend unbekannt. Interessanterweise leiden 75% der Patienten mit PSC an einer Chronisch Entzündlichen Darmerkrankung [16, 86], wobei es gegenwärtig nicht klar ist, ob die PSC die CED begünstigt oder vice versa.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Zusammenhänge zwischen einer Chronisch Entzündlichen Darmerkrankung und der PSC zu untersuchen. Dabei stand insbesondere die Rolle des Immunsystems im Zentrum der Untersuchungen.

4.1 Eine Dickdarmentzündung führt zu einer Akkumulation von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in der Leber

Interessanterweise führte die Induktion einer akuten sowie chronischen DSS-Kolitis bei Wildtyp Mäusen zu einer Akkumulation von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in der Leber. Die beobachteten Effekte waren bei der chronischen im Vergleich zu der akuten DSS-Kolitis deutlicher ausgeprägt. Eine tatsächliche Entwicklung einer Leberpathologie in Form einer verstärkten Fibrosierung oder Erhöhung der Lebertransaminasen im Blut konnte bei den Versuchen jedoch nicht festgestellt werden. Auch der Transfer von *in vitro* differenzierten T_H17 Zellen in lymphopene *Rag1*^{-/-} Mäuse führte, neben der Induktion einer Dickdarmentzündung, zu einer Akkumulation insbesondere von T_H17 und granulozytären Zellen in der Leber.

Eine mögliche Erklärung für den vermehrten Einstrom von Immunzellen könnte sein, dass es durch die intestinale Inflammation zu einer Barrierestörung im Darm kommt. Auf diese Weise ist es möglich, dass bakterielle Bestandteile, sogenannte Pathogen assoziierten Molekularen Mustern (PAMPs), über das Pfortader-System in die Leber gelangen und dort zu einer Aktivierung von Entzündungskaskaden führen. Die in diesem Prozess freiwerdenden Zytokine und Chemokine fördern die Rekrutierung von unterschiedlichen Immunzellen in die Leber. Das beschriebene pathophysiologische Modell für den Zusammenhang zwischen Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen und der Primär Sklerosierenden Cholangitis, ist im Allgemeinen als „leaky gut“-Hypothese bekannt. [87]

Passend zu dieser Hypothese konnten Studien, die die Auswirkungen einer intestinalen Inflammation auf die Ausbildung einer Nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) bei Mäusen untersucht haben, zeigen, dass es im Rahmen einer DSS-Kolitis zu einer vermehrten Einschwemmung von PAMPs in das Pfortadersystem kommt [88, 89]. Diese PAMPs, zu denen auch das Lipopolysaccharid (LPS) gehört, sind in der Lage das angeborene Immunsystem über TLR (Toll like receptor)-4 und TLR-9 zu aktivieren und somit eine inflammatorische Kaskade in Gang zu setzen [90, 91]. Dabei scheinen Kupffer-Zellen, die leberspezifischen Makrophagen, und Ito-Zellen durch die Expression von pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Mediatoren eine Hauptrolle in der Leber zu spielen [92].

Es gibt zahlreiche tierexperimentelle Studien, in denen die Rolle der TLR-4-Signalkaskade im Rahmen einer intestinalen Barrierestörung auf die Entwicklung einer Hepatopathie untersucht wurde. So konnten Kasmin *et al.* zeigen, dass eine DSS-induzierte intestinale Barrierestörung über einen TLR-4-abhängigen Pathomechanismus zu einer verstärkten Leberschädigung im Rahmen einer parenteralen Ernährung führt [93]. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte für die Gallengangsligation, ein mechanisches Cholestasemodell, zeigen, dass die Interaktion von bakteriellen Produkten aus dem Verdauungstrakt, wie LPS und TLR-4 eine herausragende Rolle bei der Manifestation einer Leberfibrose in diesem Modell spielt [94]. In einer weiteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass TLR-4 im *Mdr2*^{-/-} Mausmodell, also einem Modell für hepatische Fibrose, maßgeblich an dieser beteiligt ist. So war bei *Mdr2*^{-/-}*Tlr4*^{-/-} Mäusen die Leberfibrose im Vergleich zu den *Mdr2*^{-/-}*Tlr4*^{+/+} Mäusen zwar signifikant reduziert, die Anzeichen für eine Leberentzündung wurden dagegen bei einer TLR4-Defizienz verstärkt [95]. Die dargestellten Studien konnten eindrucksvoll den Einfluss einer intestinalen Barrierestörung, sowie die Rolle des angeborenen Immunsystems bei der Entstehung einer Hepatopathie demonstrieren. Die in dieser Arbeit bei der akuten und chronischen DSS-Kolitis sowie der Transferkolitis festgestellte verstärkte Akkumulation von Zellen des angeborenen Immunsystems in der Leber könnten durch eine LPS-induzierte Aktivierung von Kupffer- und/oder Ito-Zellen und der anschließenden Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine zu erklären sein. Zwar gelang ein direkter Nachweis des LPS aus dem portalvenösen Blut bei der akuten und chronischen DSS-Kolitis bei Wildtyp Mäusen aus technischen Gründen nicht, die vermehrte hepatische Expression von *Il6*, *Tnfa* und *Cxcl1* könnte jedoch einen indirekten Hinweis auf die Aktivierung dieser Zellen geben. Unterstützt wird diese Vermutung von den Beobachtungen von Bigorgne *et al.*, die eine TLR4-abhängige Expression von *Cxcl1* durch Sternzellen unter homöostatischen Bedingungen zeigten. Eine

antibiotische Depletion der Darmflora führte, ebenso wie eine *Tlr4*-Defizienz, zu einer reduzierten hepatischen *Cxcl1* Expression und eine darauffolgende reduzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Leber [96].

Im Rahmen einer akuten wie auch chronischen DSS-Kolitis kam es in der Leber der Wildtyp Mäuse nicht nur zu einer Akkumulation von Zellen des angeborenen Immunsystems, sondern auch von Zellen des adaptiven Immunsystems. Dabei handelte es sich insbesondere um T_H17 und T_H1+T_H17 Zellen. Diese Zellpopulationen werden im Allgemeinen als pro-inflammatorische Subpopulation der $CD4^+$ T-Zellen betrachtet [59, 97, 98]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass diese Zellen für die Aufrechterhaltung bzw. Exazerbation einer Kolitis nach dem Transfer in einen lymphopenen Rezipienten verantwortlich sind [99]. Unterstützt wird diese These auch durch die in dieser Arbeit durchgeführten Transferkolitis Experimente, bei denen *in vitro* differenzierte T_H17 Zellen in *Rag1*^{-/-} Mäuse transferiert wurden und zu der Entwicklung einer Dickdarmentzündung führten. Auch diese Form der Dickdarmentzündung führte zu einer Akkumulation von T_H17 Zellen in der Leber. Interessanterweise konnte in einer Studie gezeigt werden, dass PSC-Patienten im Bereich der Gallengänge vermehrt T_H17 Zellen aufweisen [82]. Auch bei Mausmodellen für eine Cholestase, wie der Gallengangligatur, und Leberentzündung, wie die Applikation von Tetrachlormethan (CCl_4), konnte eine pathogene Rolle von T_H17 Zellen bzw. ihrem Schlüsselzytokin IL-17A berichtet werden [100, 101].

Es stellt sich die Frage, wie es zu einer Rekrutierung der T_H17 und T_H1+T_H17 Zellen während einer DSS-Kolitis bzw. der T_H17 Zellen während der Transferkolitis in die Leber kommt. Mikami *et al.* konnten zeigen, dass es im Rahmen einer akuten DSS-Kolitis, aber auch nach dem adoptiven Transfer von RB^{high} T-Zellen zu einer Änderung der Zusammensetzung der antigenpräsentierenden Zellen in der Leber kommt. Diese Änderung trägt schließlich dazu bei, dass vermehrt T-Zellen angelockt werden bzw. naive T-Zellen in die entsprechenden Subpopulationen differenzieren [102]. Somit wäre es denkbar, dass die antigenpräsentierenden Zellen in der Leber während einer DSS-Kolitis aber auch nach dem Transfer von T_H17 Zellen in *Rag1*^{-/-} Mäuse aktiviert werden und dadurch zu einer Akkumulation der T_H17 und T_H1+T_H17 Zellen in der Leber beitragen.

Eine weitere Hypothese für die Rekrutierung von T-Zellen aus dem Darm in die Leber ist die hepatische Expression von CCL25, dem Liganden des auf T-Zellen exprimierten Rezeptors CCR9. Normalerweise wird CCL25 im Epithel und von mukosalen Gefäßen des Dünndarms exprimiert [103]. Unter homöostatischen Bedingungen, also ohne das Vorhandensein

irgendeiner Form der Entzündung, ist kaum eine Expression des *Ccl25* im Kolon des Menschen und bei Wildtyp Mäusen zu messen. Erst die Entzündung des Dickdarms führt bei beiden Spezies zu einer deutlichen Steigerung der *Ccl25* Expression im selbigen [104, 105]. Einige Studien bei PSC-Patienten konnten dementsprechend zeigen, dass diese Patienten eine vermehrte *Ccl25* Expression in der Leber aufweisen [106]. Unsere Analysen in der akuten DSS-Kolitis bei Wildtyp Mäusen konnten, trotz verstärkter Akkumulation von T_H17 und T_H1+T_H17 Zellen, jedoch keine erhöhte Expression des *Ccl25* nachweisen. Stattdessen war bei der chronischen DSS-Kolitis die Expression des *Ccl25* in der Behandlungsgruppe sogar signifikant verringert.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit Wildtyp Mäusen konnten zeigen, dass eine DSS-Kolitis zwar zu einer Akkumulation von als pro-inflammatorisch geltenden Zellen in der Leber führte, sich jedoch klinisch-chemisch sowie histopathologisch keine ernsthafte Schädigung der Leber nachweisen ließ. Aus diesem Grund sollte als Nächstes der Frage nachgegangen werden, ob eine Kolitisinduktion bei einem zuvor existierenden PSC-ähnlichen Phänotyp zu einer Verschlechterung der Leberpathologie führen würde.

Um dieses Vorhaben umzusetzen, wurden *Mdr2*^{-/-} Mäuse akut und chronisch mit DSS behandelt. Auch in diesem Fall konnte gezeigt werden, dass insbesondere granulozytäre und monozytäre Zellen neben CD4⁺ T-Zellen in der Leber akkumulierten. Anders als erwartet, führte die DSS-Behandlung bei den *Mdr2*^{-/-} Mäusen zu einer Reduktion der Lebertransaminasen. Die Leberfibrose wurde durch die intestinale Entzündung und die daraufhin folgende Infiltration von pro-inflammatorischen Zellen in die Leber nicht negativ beeinflusst. Stattdessen zeigte sich die Leberfibrose bei den DSS behandelten *Mdr2*^{-/-} Mäusen altersabhängig unterschiedlich stark beeinflusst. So führte eine DSS-Kolitis bei 6-8 Wochen alten Tieren zu einer geringeren Reduktion der Leberfibrose im Vergleich zu 12-14 Wochen alten Mäusen (Vorarbeiten der Arbeitsgruppe). Da *Mdr2*^{-/-} Mäuse bereits kurze Zeit nach der Geburt Zeichen einer Hepatitis entwickeln und sich erst anschließend eine Fibrosierung ausbildet [45, 47], könnte dies ein möglicher Erklärungsansatz für die beobachtete altersabhängige Reduktion der Fibrose im Rahmen einer DSS-Kolitis sein.

Neben der ‚leaky gut‘-Hypothese gibt es noch weitere Erklärungsansätze für die Pathogenese der PSC. Einige Mausmodelle, wie das *Mdr2*^{-/-}-Modell oder die Verwendung der Gallengangsligation, haben zu der Formulierung der ‚toxischen Galle‘-Hypothese geführt. Laut dieser führt die Bildung toxischer Gallensäuren bzw. eine Änderung der Gallensäurezusammensetzung zu einer entzündlichen Reaktion des Gallengangepithels. [87]

Im Zusammenhang mit der beschriebenen Hypothese stellt sich die Frage, ob die DSS-Behandlung zu einer Änderung der Gallensäurezusammensetzung führt und somit eventuell zu dem beobachteten Phänomen des reduzierten Leberschadens. Jahnel *et al.* konnten zeigen, dass eine DSS-Behandlung sowohl von Wildtyp Mäusen als auch von *Mdr2*^{+/-} Mäusen zu einer erhöhten Konzentration von Phospholipiden in der Gallenflüssigkeit führt [107]. Eine denkbare Erklärung für den reduzierten Leberschaden der DSS-behandelten *Mdr2*^{-/-} Mäuse könnte somit eine bessere Löslichkeit und damit einhergehend ein verbesserter Abfluss der Galle sein. Um diesem Erklärungsansatz nachgehen zu können, sollte in zukünftigen Experimenten ein DSS unabhängiges Kolitismodell in Kombination mit dem *Mdr2*^{-/-} Mausmodell verwendet werden. So wäre beispielsweise das *Il10*^{-/-} Mausmodell [108], als Modell für eine spontane Kolitis, in Kombination mit dem *Mdr2*^{-/-} Mausmodell denkbar. Alternativ könnte versucht werden mittels Oxazolone-Kolitis [109], also einer hapteninduzierten Dickdarmentzündung, die Effekte der Kolitis auf eine bereits existierende PSC-ähnliche Leberpathologie zu untersuchen.

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Reduktion der Leberpathologie durch eine DSS-Behandlung abhängig von dem Leberschadensmodell ist, wurde daher bei DDC-behandelten Wildtyp Mäusen eine DSS-Kolitis induziert. Auch in diesem Mausmodell der Primär Sklerosierenden Cholangitis konnte nach Induktion einer akuten DSS-Kolitis eine Reduktion der Lebertransaminasen im Blut festgestellt werden. Im Vergleich mit *Mdr2*^{-/-} Mäusen war die histopathologisch festgestellte Fibrose der Leber in dem DDC-Mausmodell weniger stark ausgeprägt. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass eine kurzfristige DSS-Behandlung kaum Auswirkungen auf die gering ausgeprägte Leberfibrose hatte. Zu beachten ist, dass sich die Tiere nach Absetzen des DDC rasch erholen und eine Fibrose zum Teil reversibel ist [48]. Um die Tiere nicht übermäßigem Stress auszusetzen, wurden die Experimente so geplant, dass zunächst zwischen dem Absetzen des DDC und dem Ansetzen des DSS vier Tagen lagen. Somit lagen zwischen dem Absetzen des DDC und der Organentnahme 13 Tage. Dies könnte eine Begründung dafür sein, dass zum einen die Fibrose bei beiden Gruppen nicht so stark ausgeprägt war und ein potentieller Einfluss der Kolitis folglich nicht mehr nachweisbar war. Unterstützt wird diese Überlegung auch durch die zelluläre Analyse der Leber, die insbesondere eine Reduktion der monozytären Zellen in der Leber nach einer Doppelbehandlung der Tiere mit DDC und DSS zeigte. Eine zelluläre Analyse unmittelbar nach Absetzen des DDCs hätte vermutlich zu einer erhöhten Zahl an proinflammatorischen Zellen in der Leber geführt. In zukünftigen Experimenten könnten die Tiere über einen längeren Zeitraum mit DDC behandelt werden. Alternativ könnte versucht

werden, die Induktion der Fibrose mit der Induktion einer Kolitis zu kombinieren. Zu beachten wäre dabei jedoch, dass zum aktuellen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt ist, welchen Einfluss eine Dickdarmentzündung bei der Entstehung einer Leberfibrose hat.

Insgesamt konnten die Arbeiten zeigen, dass eine DSS-Behandlung eine Akkumulation von Leukozyten in der Leber fördert. Diese führte jedoch, anders als erwartet, weder zu einer Verschlechterung eines bereits bestehenden Leberschadens, noch zu einer Induktion einer Leberpathologie bei zuvor lebergesunden Tieren. Überraschenderweise erwies sich eine durch DSS induzierte Kolitis sogar als hepatoprotektiv.

4.2 Bei den Zellen, die aus dem Kolon während einer DSS-Kolitis in die Leber migrieren, handelt es sich um Zellen des adaptiven Immunsystems

Während einer DSS-Kolitis konnte eine Akkumulation von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in der Leber festgestellt werden. Dabei stellte sich die Frage, ob diese Zellen direkt aus dem entzündeten Kolon in die Leber migrieren oder sekundär als Folge einer lokalen Entzündung in die Leber einwandern. Bisher ist es nicht gelungen, einen direkten Nachweis zu erbringen, dass Zellen aus einem entzündeten Darm direkt in die Leber einwandern. Neben der ‚leaky gut‘-Hypothese gibt es noch weitere Erklärungsansätze für diese Beobachtung. So konnten Eksteen *et al.* in den Lebern von PSC-Patienten zeigen, dass diese das darmspezifische *Ccl25* exprimieren und dieses somit zu einer Rekrutierung von darmspezifischen Lymphozyten führt [106]. Dabei ist festzuhalten, dass dies nicht bedeutet, dass die T-Zellen unmittelbar aus dem Darm in die Leber einwandern. Unter homöostatischen Bedingungen ist kaum eine Expression des *Ccl25* im Kolon des Menschen und bei Wildtyp Mäusen zu messen. Erst die Entzündung des Kolons führt bei beiden Spezies zu einer deutlichen Steigerung der *Ccl25* Expression im Kolon [104, 105].

Die *Kaede* Maus ist ein etablierter Modellorganismus zur Studie von Zellmigration [67]. Morton *et al.* konnten bereits zeigen, dass unter homöostatischen Bedingungen Immunzellen aus dem distalen Teil des Kolons innerhalb des gesamten Verdauungstraktes, ihren assoziierten Lymphknoten und in die Milz migrieren [69]. Des Weiteren konnte mit Hilfe der *Kaede* Maus gezeigt werden, dass Immunzellen während einer autoimmunen Glomerulonephritis aus dem Darm unmittelbar in die Niere einwandern [70]. Mit Hilfe der *Kaede* Maus sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob die Zellen, die während einer DSS-Kolitis in der Leber akkumulieren direkt aus dem Darm stammen.

Nach erfolgreicher Etablierung des Mausmodells, konnte gezeigt werden, dass zumindest ein Teil der Zellen aus dem distalen Anteil des Kolons in die Leber DSS-behandelter Tiere migrieren. Dabei zeigte sich, dass unter homöostatischen Bedingungen nur ein geringer Anteil, der in der Leber detektierten Zellen direkt aus dem distalen Kolon stammen. Bei der weiteren Differenzierung der detektierten Zellen konnten vor allem B220⁺ Zellen als direkt aus dem Kolon stammend identifiziert werden. Die Tatsache, dass B-Zellsubpopulationen eine hohe Mobilität im Rahmen einer Kolitis aufweisen wird auch von einer Studie gestützt, bei der erhöhte Frequenzen an gut-homing Plasmablasten im peripheren Blut pädiatrischer Kolitis ulcerosa Patienten nachgewiesen werden konnten [110].

In einer anderen Studie konnte dagegen gezeigt werden, dass eine alkoholinduzierte Lebererkrankung bei Mäusen ebenfalls zu einer Akkumulation von IgA⁺ Plasmablasten und Plasmazellen aus den Peyerplaques des Dünndarms in der Leber führt [111]. Dabei ist wichtig festzuhalten, dass der chronische Alkoholkonsum, ebenso wie eine DSS-Behandlung, zu einer intestinalen Barrieredysfunktion führt [112].

Um zu untersuchen, ob während einer T-zellabhängigen Kolitis T-Zellen aus dem Darm in die Leber einwandern, erfolgte bei *Rag1*^{-/-} Mäuse der Transfer von CD4⁺ CD44⁻ CD25⁻ (naive) bzw. CD4⁺ CD44⁺ CD25⁺ T-Zellen aus *Kaede* Mäusen. Die durchflusszytometrische Analyse der KAEDE rot⁺ Zellen in der Leber zeigte, dass T-Zellen während einer T-zellabhängigen Dickdarmentzündung direkt aus dem Kolon kommend die Leber infiltrierten. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit einer Studie, bei der gezeigt werden konnte, dass die Memory T-Zellen in der Leber und dem Kolon von Patienten, die an einer PSC und einer CED leiden den gleichen klonalen Ursprung haben [113].

Abschließend wurde untersucht, in welchem Ausmaß ein zuvor bestehender PSC-ähnlicher Phänotyp einen Einfluss auf die Migration von Immunzellen aus dem Kolon in die Leber während einer Dickdarmentzündung hat. Dafür wurden *Mdr2*^{-/-} Mäuse zunächst letal bestrahlt, mit *Kaede* Knochenmark repopuliert und schließlich akut oder chronisch mit DSS behandelt. Ähnlich wie bei der akuten DSS-Kolitis in *Kaede* Mäusen, so zeigte sich auch in diesem Versuchsaufbau, dass insbesondere B220⁺ Zellen aus dem Kolon in die Leber einwanderten. Dabei ist zu beachten, dass bei der chronischen DSS-Kolitis zusätzlich auch T-Zellen aus dem Kolon in die Leber migrierten. Die Zellen des angeborenen Immunsystems waren kaum als aus dem Kolon stammend zu identifizieren.

Insgesamt muss festgehalten werden, dass bei den Migrationsexperimenten nur eine geringe Frequenz an KAEDE rot⁺ Zellen detektiert werden konnte und daher eine weitere Differenzierung der Zellen nicht möglich war. Dies ist womöglich auch darauf zurückzuführen, dass mit dem verwendeten Kleintierendoskop maximal die distalen 4 cm des Kolons eingesehen werden konnten. Über das Migrationsverhalten der Zellen aus dem Kolon transversum, ascendens und dem Caecum konnten somit keine Aussagen getroffen werden. Während einer DSS-Kolitis ist jedoch das gesamte Kolon entzündet. Für die Ausprägung der Kolitis bei der PSC gibt es in der Literatur etwas unterschiedliche Aussagen. Insbesondere in Bezug auf die backwash ileitis gibt es unterschiedliche Aussagen zur Häufigkeit bei der PSC. Alle Studien kommen jedoch zu dem Ergebnis, dass die PSC-Patienten vor allem an einer Pankolitis leiden [3-5]. Diese Tatsache verdeutlicht, dass die durch die *Kaede* Experimente

erhobenen Befunde nur zu einem gewissen Maße das Migrationsverhalten im Rahmen einer Kolitis widerspiegeln. Zukünftig werden Experimente benötigt, die auch den restlichen Anteil des Kolons während der Entzündung berücksichtigen.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass es im Rahmen einer DSS-Kolitis zu einer Migration insbesondere von B-Zellen aus dem Darm in die Leber kommt. Bei einer chronischen Entzündung im Kolon und einer T-zellabhängigen Kolitis kommt es auch zu einer Migration von T-Zellen in die Leber. Die Zellen des angeborenen Immunsystems scheinen dagegen nicht aus dem Darm in die Leber zu migrieren. Das Vorhandensein einer Leberpathologie schien keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten zu haben.

4.3 T-Zellabhängige Kolitis-Modelle haben keinen Einfluss auf die Leberpathologie in *Mdr2*^{-/-} Mäusen

Im nächsten Schritt sollte evaluiert werden, ob eventuell ein alternatives Kolitismodell zu einer Beeinflussung einer zuvor bestehenden Leberpathologie führen würde. Da die DSS-Kolitis sowohl in Wildtyp Mäusen als auch in *Mdr2*^{-/-} Mäusen zu erhöhten Frequenzen und absoluten Zellzahlen an T_H17 und T_H1+T_H17 Zellen in der Leber führte, wurden T-zellabhängige Kolitismodelle zur Analyse herangezogen. Für unterschiedliche Mausmodelle der Leberfibrose konnte bisher vor allem gezeigt werden, dass die Abwesenheit von T_H17 Zellen bzw. ihrem Schlüsselzytokin IL-17A zu einer reduzierten Leberfibrose führt [100, 101]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass bei PSC-Patienten vermehrt T_H17 Zellen in der Leber lokalisiert sind [82]. Auch Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen scheinen mit einer verstärkten Expression T_H17 Zell assoziierter Gene einher zu gehen [25, 114]. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass der Transfer von *in vivo* und *in vitro* differenzierten T_H17 Zellen in einen lymphopenen Rezipienten zu der Ausbildung einer Dickdarmentzündung führt [55-58, 99]. Da die T_H17 Zellen sowohl bei der CED als auch bei der PSC eine Rolle spielen, wurde diese Zellpopulation bei der Pathogenese beider Erkrankungen genauer analysiert.

Der Transfer von *in vitro* differenzierten T_H17 Zellen in *Rag1*^{-/-}*Mdr2*^{-/-} Mäusen führte zwar im Vergleich zum Transfer der T_H1 Zellen zu einer milden bis moderaten intestinalen Entzündung, diese hatte jedoch keinen Einfluss auf die Leberpathologie. So unterschieden sich weder die Lebertransaminasen noch der histopathologische Befund der Leber zwischen beiden Versuchsgruppen. Auch die zelluläre Analyse der Leber auf proinflammatorische Zellen zeigte weder für das angeborene noch das adaptive Immunsystem einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen. Da die Dickdarmentzündung in diesem Fall wesentlich milder ausfiel als bei der DSS-Kolitis, könnte dies ein Grund dafür sein, dass die beobachtete Zellakkumulation in der Leber während der DSS-Kolitis nach einem Transfer von T_H17 Zellen nicht auftritt. Eine mögliche Erklärung für die nur mild ausgeprägte Kolitis könnte sein, dass aufgrund der *Mdr2*-Defizienz und der damit vermutlich verbundenen Beeinflussung der Gallensäurezusammensetzung auch eine bestimmte Zusammensetzung der Darmflora begünstigt wird. Das veränderte Mikrobiom könnte dann die Kolitisanfälligkeit der Tiere beeinflussen [115].

Um ein alternatives T-zellabhängiges Kolitis-Modell zu testen, wurden *Mdr2*^{-/-} Mäuse mit dem darmpathogenen Keim *Citrobacter rodentium* infiziert. Raczynski *et al.* konnten bereits

für Wildtyp Mäuse zeigen, dass eine Infektion mit diesem Keim zu einer entzündlichen Reaktion der Leber führt [116]. Bei der Analyse der klinischen Verlaufparameter fiel auf, dass die Lebertransaminasen bei den infizierten *MDR2*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu der Kontrollgruppe tendenziell niedriger waren. Die histopathologische Beurteilung der Leberentzündung sowie der Fibrose ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Interessanterweise konnten bei den infizierten Tieren ähnlich wie bei der akuten DSS-Kolitis signifikant erhöhte Zahlen an T_H17 und T_H1+T_H17-Zellen in der Leber festgestellt werden. Die Zellen des angeborenen Immunsystems waren in keiner Weise in Frequenz und absoluter Zellzahl in den Lebern infizierter Tiere verändert. Da die Akkumulation von pro-inflammatorischen Zellen in der Leber bei diesem infektiösen Kolitis-Modell im Vergleich zur DSS-Kolitis weniger stark ausgeprägt war, könnte dies ein Grund dafür sein, dass die Leberpathologie kaum beeinflusst wurde.

Obwohl während einer DSS-Kolitis T-Zellen im Kolon und der Leber akkumulierten, konnte für T-zellabhängige Kolitis-Modelle kein negativer Effekt auf eine bereits bestehende Leberpathologie festgestellt werden.

4.4 Die Zellen des adaptiven Immunsystems sind nicht verantwortlich für den beobachteten Phänotyp in *Mdr2*^{-/-} Mäusen

Die Induktion der DSS-Kolitis in Wildtyp sowie *Mdr2*^{-/-} Mäusen konnten zeigen, dass es im Rahmen einer intestinalen Inflammation zu einer vermehrten Akkumulation von T_H17 und T_H1+T_H17 Zellen in der Leber kommt.

Um zu untersuchen, welche Rolle CD4⁺ T-Zellen bei dem beobachteten Phänotyp spielen, wurden *Mdr2*^{-/-} Mäuse während des Verlaufs einer chronischen DSS-Kolitis mit einem depletierenden CD4⁺-Antikörper behandelt. Wie bereits durch Axelsson *et al.* für die akute DSS-Kolitis in Wildtyp-Mäusen gezeigt werden konnte [117], führte auch bei den *Mdr2*^{-/-} Mäusen eine Neutralisierung der CD4⁺ T-Zellen während einer DSS-Behandlung zu keiner Beeinflussung der Schwere der Dickdarmentzündung. Die Leberentzündung wurde durch die Depletion ebenfalls nicht beeinflusst. Interessanterweise konnte auch in diesem Fall bei den mit DSS-behandelten Tieren, ungeachtet der Tatsache, ob die CD4⁺ Zellen depletiert worden waren oder nicht, eine Reduktion der Lebertransaminasen beobachtet werden. Einschränkend muss erwähnt werden, dass eine vollständige Depletion der CD4⁺ T-Zellen in dem gewählten Versuchsaufbau nicht gelungen ist. Dennoch zeigten sich in den Lebern von depletierten Tieren reduzierte Frequenzen der CD4⁺ T-Zellen. Allerdings waren bei den anti-CD4⁺- und DSS-behandelten Tieren die Frequenzen und absoluten Zellzahlen der T_H17 und T_H1+T_H17 Zellen in den Lebern im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant verändert.

Aufgrund der insuffizienten Depletion der CD4⁺ T-Zellen, wurden im nächsten Schritt *Rag1*^{-/-} *Mdr2*^{-/-} Mäuse chronisch mit DSS behandelt. *Rag1*^{-/-} Mäuse haben auf Grund des knock out des *Rag1*-Gens, der zu einem Defekt der V(D)J Recombinase führt, keine reifen T- und B-Lymphozyten. [71, 118]

Im direkten Vergleich von *Mdr2*^{-/-} und *Rag1*^{-/-}*Mdr2*^{-/-} Mäusen konnten keine Unterschiede bezüglich einer DSS-Kolitis-Anfälligkeit festgestellt werden. Bei der Betrachtung der Histopathologie der Leber konnten keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Dabei ist festzuhalten, dass die DSS-behandelten *Mdr2*^{-/-} Mäuse in der Tendenz den geringsten Grad der Fibrose aufwiesen. Da in diesem Versuch die Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe sehr gering war, die interindividuellen Schwankungen bezüglich der Fibrose jedoch sehr hoch, gestaltete sich die statistische Auswertung schwierig. Eindeutig war hingegen, dass auch in diesem Versuch die ALT-Werte, der DSS-behandelten Tiere, deutlich unterhalb der Werte, der unbehandelten Tiere

lagen. Auch für diesen Versuchsaufbau konnte gezeigt werden, dass die Lebern der DSS-behandelten Tiere höhere Frequenzen und absolute Zellzahlen aufwiesen als die der unbehandelten Tiere. Dabei gilt es zu beachten, dass die Tiere mit einem Knock out des *Rag1* Gens eine höhere Frequenz an Zellen des angeborenen Immunsystems aufweisen, als dies für die Tiere mit der Wildtypform des *Rag1*-Gens der Fall ist [119].

Somit konnte gezeigt werden, dass das adaptive Immunsystem weder die Leberpathologie im *Mdr2*^{-/-} Mausmodell unter homöostatischen Bedingungen negativ beeinflusst, noch während einer DSS-Kolitis zu einer Verschlechterung des PSC-ähnlichen Phänotyps beiträgt. Des Weiteren scheint das adaptive Immunsystem nicht zwangsläufig für die klinische Verbesserung der Leberpathologie während einer DSS-Kolitis in *Mdr2*^{-/-} Mäusen ausschlaggebend zu sein, wobei hier weitere Untersuchungen notwendig sind.

4.5 MMP8 ist nicht verantwortlich für die beobachtete Reduktion der Leberfibrose im Rahmen einer DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen

Die MMP8 ist eine Matrixmetalloproteinase, die unter anderem für den Abbau bzw. die Modulation von Bestandteilen der extrazellulären Matrix verantwortlich ist. Kollagen Typ1, einer der Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix einer fibrotischen Leber, ist eines der Hauptsubstrate dieses Enzyms. Eine weitere Funktion besteht darin, Chemokine wie CXCL9 und CXCL10 zu spalten bzw. ihre Funktion zu modulieren [120]. *Mmp8* wird vor allem von Granulozyten, daher auch der alternative Name Neutrophilen Kollagenase, aber auch von Gallengangsepithelien, Chondrozyten, Endothelzellen und synovialen Fibroblasten exprimiert [84, 85].

Unterschiedliche Studien konnten bisher eine besondere Rolle der MMP8 im Rahmen einer Leberfibrose feststellen. So konnte eine Gruppe zeigen, dass Ratten, die eine adenovirale Überexpression der humanen *Mmp8* aufweisen, in zwei unterschiedlichen Leberfibrosemodellen eine reduzierte Fibrose im Vergleich zu den Kontrollen aufweisen [121]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte demonstrieren, dass eine Depletion der Granulozyten bei Ratten zu einem reduzierten Abbau des fibrotischen Materials im Rahmen einer Gallengangsligatur führt [84].

Interessanterweise führte eine DSS-Kolitis, sowohl akut als auch chronisch, zu einer deutlichen Steigerung der *Mmp8* Expression in der Leber von Wildtyp Mäusen. Die gleiche Beobachtung konnte für die akute DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen gemacht werden. Um die Rolle der MMP8 auf die Fibrose bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen untersuchen zu können, erfolgte eine Knochenmarkstransplantation von *Mmp8*^{-/-} Knochenmark in *Mdr2*^{-/-} Mäuse. Anschließend wurden die Tiere chronisch mit DSS behandelt. Da die Anzahl der verwendeten Tiere in den Kontrollgruppen mit jeweils nur drei Tieren eher gering war, konnte aus diesem Versuchsaufbau nur eine Tendenz abgeleitet werden. So hatte die Abwesenheit der MMP8 keinen Einfluss auf die Kolitisanfälligkeit oder den Grad der Leberentzündung. Bei Betrachtung der Leberfibrose zeigte sich jedoch, dass in der Tendenz die Abwesenheit der MMP8 den beobachteten protektiven Effekt einer DSS-Kolitis bei den *Mdr2*^{-/-} Mäusen wieder aufzuheben schien. Zusätzlich führte sie zu einer reduzierten Frequenz und absoluten Zellzahl an monozytären und T_H17 Zellen in der Leber von DSS-behandelten Tieren.

Neben unterschiedlichen Chemokinen ist MMP8 auch in der Lage Interleukin (IL)-10 zu spalten. So konnten Folgueras *et al.* zeigen, dass *Mmp8*^{-/-} Mäuse im Rahmen einer EAE, der

experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, erhöhte IL-10-Mengen aufweisen [122]. Huber *et al.* konnten hingegen demonstrieren, dass *in vivo* die Frequenz von T_H17 Zellen über einen IL-10 vermittelten Mechanismus reduziert werden kann [99]. Eine mögliche Erklärung für die reduzierten T_H17 Zellzahlen in den Lebern der mit *Mmp8*^{-/-} Knochenmark und DSS behandelten Tiere könnte somit sein, dass das Fehlen der MMP8 durch einen reduzierten Abbau von IL-10 indirekt zu einer Reduktion der T_H17 Zellen führt.

Insgesamt kann somit festgehalten werden, dass die MMP8 im *Mdr2*^{-/-} Modell sowohl unter inflammatorischen als auch homöostatischen Bedingungen im Darm keinen signifikanten Einfluss auf die Leberpathologie hatte. Da sich jedoch in der Tendenz der protektive Effekt einer DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen in Abwesenheit der MMP8 aufzuheben schien, sollte in zukünftigen Experimenten die Anzahl der Tiere erhöht werden. Des Weiteren gilt es zu beachten, dass eine Knochenmarkstransplantation ausschließlich die Möglichkeit bietet die hämatopoetische Quelle der MMP8 zu untersuchen. Der Methodik der Knochenmarkstransplantation sind zusätzliche Einflussfaktoren auf das Experiment geschuldet. So kann bereits die Bestrahlung der Tiere eine Entzündung im Gastrointestinaltrakt verursachen. Aber auch die antibiotische Abschirmung der Tiere während der Rekonstitutionsphase kann über eine Änderung des Mikrobioms einen Einfluss auf das Experiment haben. Um die beschriebenen Einflussgrößen auszuschalten zu können, wäre eine Kreuzung der *Mmp8*^{-/-} Mäuse mit *Mdr2*^{-/-} Mäusen sinnvoll.

4.6 Die Gallensäurezusammensetzung bei Wildtyp-Mäuse und *Mdr2*^{-/-} Mäuse wird durch eine akute DSS-Kolitis in unterschiedlicher Weise beeinflusst

Gallensäuren erfüllen vielfältige Funktionen im Körper. So ermöglichen sie in ihrer Funktion als Emulgatoren die Verdauung und Aufnahme von Nahrungsfetten und fettlöslichen Vitaminen. Darüber hinaus haben sie eine bedeutende Funktion für die Regulation von Stoffwechselprozessen unterschiedlichster Gewebearten wie Leber, Fettgewebe oder Skelettmuskulatur. Des Weiteren wird ihnen ein Einfluss auf Zellen des Immunsystems zugeschrieben. Der Gallensäuremetabolismus unterliegt einer komplexen Regulation, die durch unterschiedliche endogene und exogene Einflüsse moduliert wird. Eine besondere Rolle spielt dabei die direkte Interaktion zwischen den Gallensäuren und dem enterischen Mikrobiom. Als enterisches Mikrobiom wird die Gesamtheit der im Darm vorkommenden Mikroorganismen bezeichnet. Ein Teil der Darmbakterien metabolisiert die vom Körper aus Cholesterol synthetisierten primären Gallensäuren. Die auf diese Weise entstehenden sekundären Gallensäuren werden zum Teil ausgeschieden, oder aber im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufs erneut im Darm resorbiert.

Das Wachstum manch einer Bakterienspezies wird sogar durch bestimmte Gallensäuren begünstigt. Bestimmte Ernährungsweisen haben ebenso einen modulierenden Effekt auf die Gallensäurezusammensetzung. Ob dies direkt oder indirekt über eine Modulation des Mikrobioms erfolgt, ist nicht immer eindeutig abgrenzbar. Bereits eine kurzfristige Nahrungsumstellung führt zu einer Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung, sowie zu einem veränderten bakteriellen Gallensäuremetabolismus [41]. Über eine veränderte Zusammensetzung des Mikrobioms kann es prinzipiell wiederum zu einer erhöhten Anfälligkeit für eine intestinale Entzündung kommen. So konnten Devkota *et al.* den Nachweis erbringen, dass *Il10*^{-/-} Mäuse nach der Fütterung von milchfetthaltigem Futter eine erhöhte Kolutisanfälligkeit aufweisen. Diese konnte auf eine Änderung des Mikrobioms durch eine vermehrte Synthese von Tauro-Cholsäure zurückgeführt werden [40]. Eine weitere Studie konnte darlegen, dass der Konsum von künstlichen Emulgatoren, die ein häufiger Bestandteil einer westlichen Ernährungsweise sind, zu einer Veränderung des Mikrobioms, sowie einer reduzierten intestinalen Schleimschicht bei Mäusen führt. Diese Änderung förderte sogar die Entwicklung einer Dickdarmentzündung bei genetisch prädisponierten Mäusen [27]. Eine intestinale Entzündung kann dagegen ebenfalls einen Einfluss auf das Mikrobiom haben. So konnte gezeigt werden, dass DSS-behandelte Wildtyp Mäuse bereits

nach kurzer Zeit eine deutliche Änderung der Mikrobiomzusammensetzung aufweisen [43]. Daneben spielt eine mikrobielle Dysbiose auch eine Rolle bei unterschiedlichen fibrotischen Lebererkrankungen. Für das Modell der Gallengangsligation konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es durch eine Änderung der Nahrungszusammensetzung und die damit einhergehende Dysbiose zu einer Exazerbation der Leberfibrose kommt [123]. Ein komplettes Fehlen des Mikrobioms bei keimfreien *Mdr2*^{-/-} Mäusen kann sogar die Leberpathologie verstärken [124].

Anders als von Zouh *et al.* [44] beschrieben, konnten in der vorliegenden Arbeit bei Wildtyp Mäusen, abgesehen von einer reduzierten Ausscheidung sekundärer Gallensäuren, keine signifikanten Unterschiede in der Gallensäurezusammensetzung in der Leber und dem Stuhl von DSS-behandelten und unbehandelten Tieren festgestellt werden. Lediglich die Tendenz eines erhöhten Anteils an Taurin-konjugierten Gallensäuren und eine erhöhte Gesamtmenge an Gallensäuren in der Leber konnte nachgewiesen werden. Der signifikant reduzierte Gehalt an sekundären Gallensäuren im Stuhl könnte auf eine durch die intestinale Inflammation hervorgerufene Änderung des Mikrobioms zurückzuführen sein. So konnte bereits demonstriert werden, dass eine akute DSS-Kolitis zu einer deutlichen Veränderung des Mikrobioms beiträgt [43]. Passend hierzu konnte die Analyse der Gallensäurezusammensetzung im Stuhl von CED-Patienten zeigen, dass auch bei diesen Patienten die Ausscheidung sekundärer Gallensäuren deutlich reduziert ist [125]. Nicht nur bei den Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen konnte ein Einfluss der Gallensäuren nachgewiesen werden, auch bei infektiösen Darmentzündungen spielen diese eine wichtige Rolle. So führt die Reduktion der sekundären Gallensäuren zu einer erhöhten Anfälligkeit der von *Clostridium difficile* verursachten Kolitis [126, 127]. Werden mit *C. difficile* infizierte Mäuse mit Bakterien, die am Gallensäuremetabolismus beteiligt sind, behandelt, erholen sich diese im Vergleich zu den unbehandelten Tieren rascher [126].

Durch den direkten Vergleich des Gallensäurepools zwischen Wildtyp und *Mdr2*^{-/-} Mäusen in der Leber und dem Stuhl konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass signifikante Unterschiede sowohl in der Gesamtmenge, als auch bei den konjugierten Gallensäuren in der Leber zu finden waren. Auf Grund des Fehlens des MDR2-Transporters, einer Phospholipid-Flipase, ist die Löslichkeit hydrophober Gallensäuren reduziert. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation toxischer Gallensäuren in den Gallengängen [46]. Eine mögliche Erklärung für den erhöhten Gehalt an konjugierten Gallensäuren könnte sein, dass durch die Taurinkonjugation die Löslichkeit der Gallensäuren erhöht und somit der Abfluss der selbigen

verbessert werden könnte. Die als zytoprotektiv beschriebene Gallensäure Ursodeoxycholsäure (UDCA) [124, 128] war dagegen nicht signifikant verändert.

Bei der Analyse der Gallensäurezusammensetzung bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen während einer DSS-Kolitis zeigte sich, dass die Ausscheidung der sekundären Gallensäuren im Rahmen einer DSS-Kolitis deutlich reduziert war. Diese Beobachtung könnte ebenfalls mit der Veränderung des Mikrobioms im Rahmen einer DSS-Kolitis zusammenhängen [43]. Zu diesen Beobachtungen passt auch, dass die Menge an UDCA in der Gallenblase und dem Stuhl zum Höhepunkt der Entzündung deutlich reduziert war. Interessant ist auch, dass zu Beginn der Remissionsphase die UDCA-Menge in der Gallenblase signifikant anstieg. Diese Beobachtung könnte eine Erklärung für die reduzierte Leberpathologie bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen im Rahmen einer DSS-Kolitis liefern. So konnten Tabibian *et al.* zeigen, dass UDCA in der Lage ist die Seneszenz von Cholangiozyten *in vitro* zu hemmen [124]. Des Weiteren wurde für diese sekundäre Gallensäure ein immunsuppressiver Effekt beschrieben [129].

Auch im Rahmen der DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen waren in der Tendenz die Taurin-konjugierten Gallensäuren während einer DSS-Kolitis erhöht. Da die Tauro- β -Muricholsäure (T-MCA) und die Tauro-Cholsäure (T-CA) gemeinsam den größten Anteil der konjugierten Gallensäuren ausmachten, wurde zunächst das Verhältnis dieser Gallensäuren zueinander analysiert. Während der DSS-Kolitis kam es bei den *Mdr2*^{-/-} Mäusen in der Gallenblase zu einer Verschiebung dieses Verhältnisses hin zu einem Überwiegen der T-MCA. Im Stuhl wurden dagegen keine Änderungen des Verhältnisses nachgewiesen. Sayin *et al.* [130] konnten nachweisen, dass T-MCA im Ileum als natürlicher Antagonist des intrazellulären Gallensäurerezeptors FXR über die FXR-FGF15-FGFR4-Achse die *de novo* Synthese der T-MCA in der Leber fördert. So führt eine durch T-MCA im Ileum bedingte FXR-Inhibition zu einer Reduktion der FGF15 Expression in den Enterozyten. Die reduzierte Freisetzung des FGF15 aus den Enterozyten in die Blutbahn führt wiederum in der Leber zu einer verringerten Aktivierung des FGFR4, einem Rezeptor, der inhibitorisch auf das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Gallensäuremetabolismus CYP7A1 wirkt. Auf diese Weise fördert eine erhöhte T-MCA-Menge im Ileum eine verstärkte Gallensäuresynthese in der Leber [130]. In den durchgeführten Experimenten zeigte sich ein Anstieg der Gesamtmenge an Gallensäuren im Rahmen einer DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen. Aus diesem Grund erfolgte eine Expressionsanalyse des *Cyp7a1*- und *Cyp8b1*-Gens. Anders als durch die Analyse der Gallensäuren zu erwarten gewesen wäre/war, führte die DSS-Kolitis zu einer reduzierten Expression beider Gene. Die Expression von *Fxr* und *Shp*

deren Genprodukte direkt an der Regulation der Expression der *Cyp7a1* und *Cyp8b1* beteiligt sind [37], waren dagegen in keiner Weise beeinflusst. Da die Genexpressionsanalysen weder die Proteinmenge noch die enzymatische Aktivität widerspiegeln, können keine Aussagen zu der tatsächlichen Syntheseleistung von CYP7A1 und CYP8B1 getroffen werden. Neben der bereits erwähnten Feed-back Regulation der Genexpression über die Gallensäuren existieren jedoch noch weitere Mechanismen, die einen Einfluss auf die Expression von *Cyp7a1* und *Cyp8b1* haben. So kommt es bei Mäusen beispielsweise IL-6 vermittelt zu einer Reduktion der Expression des *Cyp7a1* Gens in der Leber nach einer Infektion mit *Citrobacter rodentium* [131]. Da auch bei der DSS-Kolitis ein signifikanter Anstieg der *Il6* Expression in der Leber beobachtet werden konnte, wäre dies eine mögliche Erklärung für die reduzierte Expression dieser Gene.

Eine DSS-Kolitis bei Wildtyp Mäusen führt zu einer erhöhten Expression des *Fgf15*-Gens im Ileum sowie einer erhöhten Menge an FGF15 im Serum. Dazu passend kommt es in der Leber zu einer Hochregulation des *Fgfr4*-Gens sowie zu einer reduzierten Expression von *Cyp7a1* [132]. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit den in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen des *Cyp7a1* Gens der mit DSS-behandelten *Mdr2*^{-/-} Mäuse. Rau *et al.* konnten demonstrieren, dass eine DSS-Kolitis bei Wildtyp Mäusen, anders als in dieser Arbeit für die *Mdr2*^{-/-} Mäusen beobachtet, zu einer Reduktion der Taurin-konjugierten Gallensäuren in der Gallenblase führt [132]. Dies könnte auch mit der bereits unter homöostatischen Bedingungen deutlich unterschiedlichen Gallensäurezusammensetzung beim direkten Vergleich zwischen Wildtyp und *Mdr2*^{-/-} Maus zusammenhängen.

Dennoch bleibt die Frage offen, ob es auch bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen im Rahmen der DSS-Kolitis zu einer erhöhten Expression des *Fgf15* im Ileum kommt und auf welche Weise diese im Ileum reguliert wird. Für zukünftige Analysen ist es daher von Nöten, zusätzlich das Gallensäureprofil des Ileums während einer DSS-Kolitis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen zu studieren. Des Weiteren gilt es zu beachten, dass in der vorliegenden Arbeit lediglich Expressionsanalysen und keine Protein- bzw. Funktionalitätsnachweise der Untersuchten Enzyme und Regulatorproteine durchgeführt wurden. Um diesem Problem zu begegnen, wäre entweder ein knock out der Gene bzw. eine pharmakologische Inhibition eben jener Enzyme und Regulatorproteine denkbar. Zusätzlich gilt es zu beachten, dass durch die DSS-Kolitis insbesondere die Zusammensetzung der sekundären Gallensäuren beeinflusst war. Um dieser Beobachtung weiter nach zu gehen, wäre eine Analyse des Mikrobioms bei Wildtyp und *Mdr2*^{-/-} Mäusen unter homöostatischen Bedingungen und im Rahmen einer DSS-Kolitis

sinnvoll. Leider konnte in dieser Studie nicht abschließend die Rolle der Gallensäuren für das untersuchte Krankheitsmodell herausgearbeitet werden.

4.7 Ausblick

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten konnten in verschiedenen Mausmodellen zeigen, dass eine Dickdarmentzündung bei einer zuvor existierenden Leberpathologie diese nicht notwendigerweise verschlimmert, sondern sogar zu einer reduzierten Leberpathologie führen kann. Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage zur Formulierung folgender Hypothese: eine intestinale Entzündung hat über die Änderung des Mikrobioms einen protektiven Effekt auf eine zusätzlich bestehende Leberpathologie. Diese Hypothese wird auch durch die Arbeit von Tabibian *et al.* unterstützt. So konnte gezeigt werden, dass das Mikrobiom an der Ausprägung der Leberpathologie bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen beteiligt ist. So wiesen keimfreie *Mdr2*^{-/-} Mäuse eine verstärkte Leberpathologie auf Tabibian, O'Hara [124].

Ein tiefergehendes Verständnis der Wechselwirkung zwischen Dickdarmentzündung, Mikrobiom und Leberpathologie ist erforderlich um die zugrundeliegenden Pathomechanismen der in dieser Arbeit beschriebenen Phänotypen besser verstehen zu können. Um festzustellen, ob der beobachtete Phänotyp tatsächlich vom Mikrobiom abhängig ist, wäre die Induktion einer DSS-Kolitis bei keimfreien *Mdr2*^{-/-} Mäusen denkbar. Dabei ist zu beachten, dass eine DSS-Kolitis in keimfreien Mäusen zwar zu einer Barrierestörung jedoch nicht zu einer ausgeprägten Entzündung führt [133]. Um den Einfluss einer intestinalen Entzündung auf das Mikrobiom vor dem Hintergrund des beobachteten Phänotyps besser verstehen zu können, wäre somit eine Mikrobiomanalyse bei darmgesunden und mit DSS-behandelten *Mdr2*^{-/-} Mäusen interessant. Ergänzend wäre ein Stuhltransfer von DSS behandelten und gesunden *Mdr2*^{-/-} Mäusen in keimfreie *Mdr2*^{-/-} Mäuse möglich.

Um der Frage nach zu gehen, ob ausschließlich eine intestinale Entzündung oder auch eine Entzündung außerhalb des Verdauungstraktes zu einer Reduktion einer zuvor bestehenden Leberpathologie führen kann, wäre es notwendig ein alternatives Entzündungsmodell wie z.B. eine experimentelle Glomerulonephritis bei *Mdr2*^{-/-} Mäusen zu untersuchen.

In der Literatur gibt es bereits einzelne Berichte, die zeigen, dass Patienten, die an einer PSC und zusätzlich an einer CED erkrankt sind ein längeres, transplantfreies Überleben aufweisen als Patienten, die ausschließlich an einer PSC leiden [7]. Auf der anderen Seite gibt es jedoch auch Hinweise darauf, dass eine erhöhte Krankheitsaktivität der CED nach einer Lebertransplantation das Risiko einer Re-PSC erhöht [134]. Um die weiter oben formulierte Hypothese auch bei der humanen Erkrankung zu untersuchen, wäre es denkbar bei Patienten mit PSC und CED im Vergleich zu Patienten, die ausschließlich an einer PSC leiden, die

Krankheitsaktivität der CED mit dem klinischen Verlauf der PSC zu korrelieren und die in den vorangegangenen Tierexperimenten gemachten Beobachtungen zu verifizieren.

Diese Untersuchungen sollten zu einem besseren Verständnis der Zusammenhänge zwischen CED und PSC beitragen und sind somit für die Entwicklung neuer Therapiestrategien, aber auch für die Optimierung bereits vorhandener Therapieschemata von besonderem Interesse.

5 Zusammenfassung

Die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC) ist eine schwerwiegende Lebererkrankung, die im Rahmen einer chronischen Entzündung zu einer Obstruktion der extra- und intrahepatischen Gallengänge führt. Etwa 70% der Patienten mit einer PSC sind zusätzlich an einer Chronisch Entzündlichen Darmerkrankung (CED) erkrankt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktion der CED und der PSC im Mausmodell zu untersuchen.

In Wildtyp Mäusen konnte nach der Induktion einer akuten und chronischen Dickdarmentzündung eine verstärkte Infiltration von Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems in die Leber beobachtet werden. Dies führte nicht zu der Entstehung einer Leberpathologie, wie z.B. einer Erhöhung der Lebertransaminasen oder der Entwicklung einer Leberfibrose. Bei *Mdr2*^{-/-} Mäuse, also Tieren mit einem PSC-ähnlichen Phänotypen, führte die Induktion einer akuten bzw. einer chronischen Dickdarmentzündung ebenfalls zu einer Infiltration von pro-inflammatorischen Immunzellen in die Leber. Allerdings waren anti-inflammatorische T-Zellen ebenfalls erhöht. Der Grad der Leberfibrose zeigte sich durch die intestinale Entzündung in Abhängigkeit vom Alter der Tiere reduziert. So war die Leberfibrose bei 12-14 Wochen alten Tieren nach Induktion einer chronischen Kolitis reduziert, während sie bei 6-8 Wochen alten Tieren unbeeinflusst blieb. Überraschenderweise zeigte sich jedoch auch eine Erniedrigung der Lebertransaminasen nach der Induktion einer Dickdarmentzündung. Bei der Analyse des Migrationsverhalten der Immunzellen aus dem Darm in die Leber im Rahmen einer Dickdarmentzündung konnte gezeigt werden, dass der größte Teil der Zellen, die direkt aus dem Darm in die Leber migrierten, B-Zellen waren.

Auch bei alternativen Leberschadensmodellen führte die Induktion einer Dickdarmentzündung zu reduzierten Lebertransaminasen, während die Leberfibrose unbeeinflusst blieb. Alternative Modelle für intestinale Entzündungen wie Infektionen mit *Citrobacter rodentium* oder der Transfer von *in vitro* differenzierten T_H17 Zellen in einen lymphopenen Wirt führten zwar ebenfalls zu einer intestinalen Entzündung, allerdings zeigten sie nur in einem geringeren Maße die Akkumulation von Leukozyten in der Leber und nur eine geringfügige Beeinflussung der Lebertransaminasen.

Die Analyse der Gallensäuren im Rahmen einer Dickdarmentzündung zeigte, dass diese zu einer signifikanten Reduktion der sekundären Gallensäuren, also solchen Gallensäuren, die durch intestinale Mikroorganismen metabolisiert wurden, sowohl im Stuhl als auch in der

Leber führte. Dies wurde als Hinweis auf die Beeinflussung des Mikrobioms im Rahmen einer intestinalen Entzündung gewertet.

Somit kann festgehalten werden, dass eine intestinale Entzündung zu einer Infiltration von Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems in die Leber führte. Dabei scheinen vor allem adaptive Zellen aus dem entzündeten Darm in die Leber zu migrieren. In den von uns verwendeten Modellen scheint die Akkumulation der Immunzellen weder direkt eine Leberpathologie zu induzieren, noch bei einem zuvor bestehenden PSC-ähnlichen Leberschaden diesen zu verschlechtern. In der Tendenz zeigte sich sogar eine Verbesserung der Leberpathologie. Als Hinweis auf eine Beeinflussung des Mikrobioms durch die Kolitis zeigten sich die sekundären Gallensäuren sowohl im Stuhl als auch in der Leber reduziert. In zukünftigen Arbeiten sind weitere Analysen zur Identifikation der zugrunde liegenden Mechanismen der Kolitis-induzierten Protektion einer zuvor bestehenden Leberpathologie notwendig. Insbesondere sollte die Rolle des intestinalen Mikrobioms untersucht werden.

6 Abstract

Primary sclerosing cholangitis (PSC) is a cholestatic liver disease leading to strictures of the extra- and intrahepatic bile ducts. PSC is strongly associated with inflammatory bowel disease (IBD). The prevalence of IBD in PSC ranges from 67-73%, however, the reason for this association remains elusive.

The aim of this study was to analyse the interaction between inflammatory bowel disease and liver pathology in a murine model.

In Wildtype mice, we showed that acute and chronic DSS colitis leads to an increased infiltration of innate and adaptive immune cells in the liver. The livers of DSS treated mice showed no signs of liver fibrosis or elevated transaminases levels. Through induction of acute and chronic DSS colitis in *Mdr2*^{-/-} mice, a model for human PSC, we observed an infiltration of pro-inflammatory cell subsets in the liver. However, anti-inflammatory cells were increased as well. Interestingly, mice with colitis showed decreased liver transaminases levels and age depended reduced liver fibrosis. Furthermore, we analysed the migratory behaviour of immune cell subsets during intestinal inflammation using KAEDE transgenic mice. Within this experimental setting, most of the cells migrating from the colon to the liver, under inflammatory conditions, were B-cells.

After induction of DSS colitis in the DDC mouse model, an alternative PSC model, we observed decreased liver transaminase levels but no influence on liver fibrosis. In the next step, we wanted to know whether other models of intestinal inflammation have an influence on a pre-existing liver pathology. Respectively, we used the *Citrobacter rodentium* infection model and the transfer colitis model in *Mdr2*^{-/-} mice. For these models we did not observe any effect on the pre-existing liver pathology. But further experiments are required to confirm this finding.

Analysis of the bile acid pool of mice during intestinal inflammation in wildtype and *Mdr2*^{-/-} mice showed reduced secondary bile acids in the livers and the stool of colitic mice. We speculated that this was due to the alteration of the gut microbiota during intestinal inflammation.

In summary, we found that intestinal inflammation leads to an infiltration of innate and adaptive immune cells in the liver. Most of the cells migrating directly from the colon to the liver were adaptive cells. However, colitis did not induce liver pathology in wildtype mice or aggravate pre-existing cholestatic liver disease in *Mdr2*^{-/-} mice. Interestingly, *Mdr2*^{-/-} mice

showed reduced transaminase levels and liver fibroses after DSS colitis. We observed that DSS colitis leads to significant reduction of secondary bile acid levels in the faeces and the liver of colitic mice, which points to a potential role of the intestinal microbiota. Further investigations are necessary to identify molecular mechanisms mediating the observed effects, in particular, to analyse the influence of the intestinal microbiota.

7 Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen präsietierende Zellen
BA	Gallensäure
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankung
CA	Cholsäure
DDC	Diethyl-1,4-Dihydro-2,4,6-trimethyl-3,5-pyridinedicarboxylat
DSS	Dextran Natrium Sulfat
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
FGF-15	Fibroblast groth factor 15
FGFR4	Fibroblast groth factor receptor 4
FXR	Farnesoid X receptor
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IL	Interleukin
LPL	Lamina propria Lymphozyten
MMP8	Matrixmetalloproteinase 8
MCA	Muricholsäure
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
NTCP	Na ⁺ -Taurocholate cotransporter Polypeptid
PAMP	Pathogen assoziierten Molekularen Mustern
PSC	Primär Sklerodisierende Cholangitis
T-CA	Tauro-Cholsäure
T-MCA	Tauro-β-Muricholsäure
TLR	Toll like receptor
UDCA	Ursodeoxycholsäure

8 Literaturverzeichnis

1. Baumgart, D.C. and W.J. Sandborn, *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies*. The Lancet, 2007. **369**(9573): p. 1641-1657.
2. Danese, S. and C. Fiocchi, *Ulcerative Colitis*. New England Journal of Medicine, 2011. **365**(18): p. 1713-1725.
3. Boonstra, K., et al., *Primary sclerosing cholangitis is associated with a distinct phenotype of inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(12): p. 2270-6.
4. Loftus, E.V., et al., *PSC-IBD: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis*. Gut, 2005. **54**(1): p. 91-96.
5. Joo, *Pathologic Features of Ulcerative Colitis in Patients With Primary Sclerosing Cholangitis: A Case-control Study*. The American journal of surgical pathology, 2009. **33**(6): p. 854-862.
6. Marelli, L., et al., *Does the severity of primary sclerosing cholangitis influence the clinical course of associated ulcerative colitis?* Gut, 2011. **60**(9): p. 1224-1228.
7. Navaneethan, U., et al., *The impact of ulcerative colitis on the long-term outcome of patients with primary sclerosing cholangitis*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2012. **35**(9): p. 1045-1053.
8. Vera, A., et al., *Risk factors for recurrence of primary sclerosing cholangitis of liver allograft*. The Lancet, 2002. **360**(9349): p. 1943-1944.
9. Nordenvall, C., et al., *Colectomy prior to diagnosis of primary sclerosing cholangitis is associated with improved prognosis in a nationwide cohort study of 2594 PSC-IBD patients*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2018. **47**(2): p. 238-245.
10. Loftus Jr, E.V., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1504-1517.
11. Baumgart, D.C. and S.R. Carding, *Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology*. The Lancet. **369**(9573): p. 1627-1640.
12. Danese, S., M. Sans, and C. Fiocchi, *Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors*. Autoimmunity Reviews, 2004. **3**(5): p. 394-400.
13. Bernstein, C.N., et al., *The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study*. Am J Gastroenterol, 2001. **96**(4): p. 1116-1122.
14. Boonstra K., B.U., Ponsioen C. Y., *Epidemiology of primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis- a systematic review*. Journal of Hepatology, 2012. **56**: p. 1181-1188.
15. Silveira, M.G. and K.D. Lindor, *Primary sclerosing cholangitis*. Canadian Journal of Gastroenterology, 2008. **22**(8): p. 689-698.
16. Hirschfield, G.M., et al., *Primary sclerosing cholangitis*. The Lancet, 2013. **382**(9904): p. 1587-1599.
17. Burak, K.W., P. Angulo, and K.D. Lindor, *Is there a role for liver biopsy in primary sclerosing cholangitis[quest]*. Am J Gastroenterol, 2003. **98**(5): p. 1155-1158.
18. Chapman, R., et al., *Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis*. Hepatology, 2010. **51**(2): p. 660-78.
19. Ananthakrishnan, A.N., et al., *Mortality and Extraintestinal cancers in patients with Primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease*. Journal of Crohn's & colitis, 2014. **8**(9): p. 956-963.

20. Kornfeld, D., A. Ekblom, and T. Ihre, *Is there an excess risk for colorectal cancer in patients with ulcerative colitis and concomitant primary sclerosing cholangitis? A population based study*. Gut, 1997. **41**(4): p. 522-525.
21. Adams, D.H. and B. Eksteen, *Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(3): p. 244-251.
22. Tabibian, J.H., et al., *Cholangiocyte Senescence by Way of N-Ras Activation Is a Characteristic of Primary Sclerosing Cholangitis*. Hepatology (Baltimore, Md.), 2014. **59**(6): p. 2263-2275.
23. Tabibian, J.H., S.P. O'hara, and K.D. Lindor, *Primary sclerosing cholangitis and the microbiota: current knowledge and perspectives on etiopathogenesis and emerging therapies*. Scandinavian journal of gastroenterology, 2014. **49**(8): p. 901-908.
24. Charatchoenwithaya, P. and K. Lindor, *Primary sclerosing cholangitis: Diagnosis and management*. Current Gastroenterology Reports, 2006. **8**(1): p. 75-82.
25. Khor, B., A. Gardet, and R.J. Xavier, *Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nature, 2011. **474**(7351): p. 307-317.
26. Rogler, G. and S. Vavricka, *Exposome in IBD: Recent Insights in Environmental Factors that Influence the Onset and Course of IBD*. Inflammatory Bowel Diseases, 2015. **21**(2): p. 400-408.
27. Chassaing, B., et al., *Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome*. Nature, 2015. **519**(7541): p. 92-96.
28. Vaishnav, S., et al., *The Antibacterial Lectin RegIII α Promotes the Spatial Segregation of Microbiota and Host in the Intestine*. Science, 2011. **334**(6053): p. 255-258.
29. Nakagome, S., et al., *Crohn's Disease Risk Alleles on the NOD2 Locus Have Been Maintained by Natural Selection on Standing Variation*. Molecular Biology and Evolution, 2012. **29**(6): p. 1569-1585.
30. Musch, M.W., et al., *T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase*. The Journal of Clinical Investigation, 2002. **110**(11): p. 1739-1747.
31. Ma, T.Y., et al., *TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation*. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, 2004. **286**(3): p. G367-G376.
32. Sun, Y., et al., *Enteric neurones modulate the colonic permeability response to luminal bile acids in rat colon in vivo*. Gut, 2004. **53**(3): p. 362-367.
33. Hofmann, A.F. and L.R. Hagey, *Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology, and Therapeutics*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008. **65**(16): p. 2461-2483.
34. Hofmann, A.F., *Chemistry and Enterohepatic Circulation of Bile Acids*. Hepatology, 1984. **4**(S2): p. 4S-14S.
35. Chiang, J.Y.L., *Bile acids: regulation of synthesis*. Journal of Lipid Research, 2009. **50**(10): p. 1955-1966.
36. Jones, H., G. Alpini, and H. Francis, *Bile acid signaling and biliary functions*. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2015. **5**(2): p. 123-128.
37. Kong, B., et al., *Mechanism of Tissue-specific Farnesoid X Receptor in Suppressing the Expression of Genes in Bile-acid Synthesis in Mice*. Hepatology (Baltimore, Md.), 2012. **56**(3): p. 1034-1043.
38. Rao, A., et al., *The organic solute transporter α - β , Osta-Ost β , is essential for intestinal bile acid transport and homeostasis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(10): p. 3891-3896.

39. Goodwin, B., et al., *A Regulatory Cascade of the Nuclear Receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 Represses Bile Acid Biosynthesis*. *Molecular Cell*, 2000. **6**(3): p. 517-526.
40. Devkota S., W.Y., Musch M. W., Leone V., Fehlner-Peach H., Nadimpalli A., Antonopoulos D. A., Jabri B. & Chang E. B., *Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il102/2 mice*. *Nature*, 2012. **487**.
41. David, L.A., et al., *Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome*. *Nature*, 2014. **505**(7484): p. 559-563.
42. Daniel, H., et al., *High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice*. *The ISME Journal*, 2014. **8**(2): p. 295-308.
43. Zhang, Q., et al., *Accelerated dysbiosis of gut microbiota during aggravation of DSS-induced colitis by a butyrate-producing bacterium*. *Scientific Reports*, 2016. **6**: p. 27572.
44. Zhou, X., et al., *PPAR α -UGT axis activation represses intestinal FXR-FGF15 feedback signalling and exacerbates experimental colitis*. *Nature Communications*, 2014. **5**: p. 4573.
45. Popov, Y., et al., *Mdr2 (Abcb4)^{-/-} mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes*. *J Hepatol*, 2005. **43**(6): p. 1045-54.
46. Smit, J.J.M., et al., *Homozygous disruption of the murine MDR2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease*. *Cell*, 1993. **75**(3): p. 451-462.
47. Fickert, P., et al., *Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice*. *Gastroenterology*, 2004. **127**(1): p. 261-274.
48. Fickert, P., et al., *A New Xenobiotic-Induced Mouse Model of Sclerosing Cholangitis and Biliary Fibrosis*. *The American Journal of Pathology*, 2007. **171**(2): p. 525-536.
49. Okayasu I, H.S., Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. , *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. *Gastroenterology*, 1990. **98**(3): p. 694-702.
50. Laroui, H., et al., *Dextran Sodium Sulfate (DSS) Induces Colitis in Mice by Forming Nano-Lipocomplexes with Medium-Chain-Length Fatty Acids in the Colon*. *PLoS ONE*, 2012. **7**(3): p. e32084.
51. Cooper, H.S., et al., *Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis*. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 1993. **69**(2): p. 238-249.
52. Egger, B., et al., *Characterisation of Acute Murine Dextran Sodium Sulphate Colitis: Cytokine Profile and Dose Dependency*. *Digestion*, 2000. **62**(4): p. 240-248.
53. Philip J. Morrissey, K.C., Steven Braddy, and a.W. Denny Liggitt, *CD4⁺ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4⁺ T cells*. *The Journal of Experimental Medicine*, 1993. **178**(1): p. 237-244.
54. Powrie, F., et al., *Phenotypically distinct subsets of CD4⁺ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice*. *International Immunology*, 1993. **5**(11): p. 1461-1471.
55. Lee, Y.K., et al., *Late Developmental Plasticity in the T Helper 17 Lineage*. *Immunity*, 2009. **30**(1): p. 92-107.
56. Elson, C.O., et al., *Monoclonal Anti-Interleukin 23 Reverses Active Colitis in a T Cell-Mediated Model in Mice*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(7): p. 2359-2370.

57. Harbour, S.N., et al., *Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **112**(22): p. 7061-7066.
58. Feng, T., et al., *Th17 Cells Induce Colitis and Promote Th1 Cell Responses through IL-17 Induction of Innate IL-12 and IL-23 Production*. The Journal of Immunology, 2011. **186**(11): p. 6313-6318.
59. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-238.
60. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-234.
61. Veldhoen, M., et al., *TGF β in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-189.
62. Lexberg, M.H., et al., *Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo*. European Journal of Immunology, 2008. **38**(10): p. 2654-2664.
63. Schauer, D.B., et al., *Genetic and biochemical characterization of Citrobacter rodentium sp. nov.* Journal of Clinical Microbiology, 1995. **33**(8): p. 2064-2068.
64. Johnson, E. and S.W. Barthold, *The ultrastructure of transmissible murine colonic hyperplasia*. The American Journal of Pathology, 1979. **97**(2): p. 291-313.
65. Ivanov, I.I., et al., *Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria*. Cell, 2009. **139**(3): p. 485-498.
66. Atarashi, K., et al., *Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells*. Cell, 2015. **163**(2): p. 367-380.
67. Tomura, M., et al., *Monitoring cellular movement in vivo with photoconvertible fluorescence protein "Kaede" transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(31): p. 10871-6.
68. Mizuno, H., et al., *Photo-Induced Peptide Cleavage in the Green-to-Red Conversion of a Fluorescent Protein*. Molecular Cell. **12**(4): p. 1051-1058.
69. Morton, A.M., et al., *Endoscopic photoconversion reveals unexpectedly broad leukocyte trafficking to and from the gut*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(18): p. 6696-701.
70. Krebs, Christian F., et al., *Autoimmune Renal Disease Is Exacerbated by SIP-Receptor-1-Dependent Intestinal Th17 Cell Migration to the Kidney*. Immunity. **45**(5): p. 1078-1092.
71. Mombaerts, P., et al., *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes*. Cell. **68**(5): p. 869-877.
72. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(14): p. 5126-31.
73. Esplugues, E., et al., *Control of TH17 cells occurs in the small intestine*. Nature, 2011. **475**(7357): p. 514-8.
74. Becker, C., et al., *In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy*. Gut, 2005. **54**(7): p. 950-954.
75. Unkless, J.C., *Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors*. The Journal of Experimental Medicine, 1979. **150**(3): p. 580-596.
76. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS*. Cytometry, 1990. **11**(2): p. 231-238.
77. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Analytical Biochemistry, 1987. **162**(1): p. 156-159.

78. Kerr, T.A., et al., *Dextran Sodium Sulfate Inhibition of Real-Time PCR Amplification: A Poly-A Purification Solution*. Inflammatory bowel diseases, 2012. **18**(2): p. 344-348.
79. Desmet, V.J., Gerber, M., Hoofnagle, J. H., Manns, M. and Scheuer, P. J. , *Classification of Chronic Hepatitis- Diagnosis, Grading and Staging*. Hepatology, 1994. **19**: p. 1513-1520.
80. Ishak, K., et al., *Histological grading and staging of chronic hepatitis*. Journal of hepatology, 1995. **22**(6): p. 696-699.
81. Hartmann, G., et al., *Specific Type IV Phosphodiesterase Inhibitor Rolipram Mitigates Experimental Colitis in Mice*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000. **292**(1): p. 22-30.
82. Katt, J., et al., *Increased T helper type 17 response to pathogen stimulation in patients with primary sclerosing cholangitis*. Hepatology, 2013. **58**(3): p. 1084-1093.
83. Collins, J.W., et al., *Citrobacter rodentium: infection, inflammation and the microbiota*. Nat Rev Micro, 2014. **12**(9): p. 612-623.
84. Harty, M.W., et al., *Neutrophil Depletion Blocks Early Collagen Degradation in Repairing Cholestatic Rat Livers*. The American Journal of Pathology, 2010. **176**(3): p. 1271-1281.
85. Harty, M.W., et al., *Repair after cholestatic liver injury correlates with neutrophil infiltration and matrix metalloproteinase 8 activity*. Surgery, 2005. **138**(2): p. 313-320.
86. Lee , Y.-M. and M.M. Kaplan *Primary Sclerosing Cholangitis*. New England Journal of Medicine, 1995. **332**(14): p. 924-933.
87. Pollheimer, M.J., et al., *Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis*. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2011. **25**(6): p. 727-739.
88. Achiwa, K., et al., *DSS colitis promotes tumorigenesis and fibrogenesis in a choline-deficient high-fat diet-induced NASH mouse model*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016. **470**(1): p. 15-21.
89. Gäbele, E., et al., *DSS induced colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH*. Journal of Hepatology, 2011. **55**(6): p. 1391-1399.
90. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
91. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. International Immunology, 2005. **17**(1): p. 1-14.
92. Seki, E. and D.A. Brenner, *Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: Update*. Hepatology, 2008. **48**(1): p. 322-335.
93. El Kasmi, K.C., et al., *Toll-like receptor 4-dependent Kupffer cell activation and liver injury in a novel mouse model of parenteral nutrition and intestinal injury*. Hepatology, 2012. **55**(5): p. 1518-1528.
94. Seki, E., et al., *TLR4 enhances TGF-[beta] signaling and hepatic fibrosis*. Nat Med, 2007. **13**(11): p. 1324-1332.
95. Weber, S.N., et al., *TLR4 Deficiency Protects against Hepatic Fibrosis and Diethylnitrosamine-Induced Pre-Carcinogenic Liver Injury in Fibrotic Liver*. PLoS ONE, 2016. **11**(7): p. e0158819.
96. Bigorgne, A.E., et al., *TLR4-Dependent Secretion by Hepatic Stellate Cells of the Neutrophil-Chemoattractant CXCL1 Mediates Liver Response to Gut Microbiota*. PLOS ONE, 2016. **11**(3): p. e0151063.
97. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of TH17 cells*. Nature, 2008. **453**(7198): p. 1051-1057.

98. Huber, S., N. Gagliani, and R.A. Flavell, *Life, death, and miracles: Th17 cells in the intestine*. European Journal of Immunology, 2012. **42**(9): p. 2238-2245.
99. Huber, S., et al., *Th17 Cells Express Interleukin-10 Receptor and Are Controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ Regulatory CD4⁺ T Cells in an Interleukin-10-Dependent Manner*. Immunity, 2011. **34**(4): p. 554-565.
100. O'Brien, K.M., et al., *IL-17A Synergistically Enhances Bile Acid-Induced Inflammation during Obstructive Cholestasis*. The American Journal of Pathology, 2013. **183**(5): p. 1498-1507.
101. Meng, F., et al., *IL-17 signaling in inflammatory cells, Kupffer cells and Hepatic Stellate cells exacerbates liver fibrosis*. Gastroenterology, 2012. **143**(3): p. 765-76.e1-3.
102. Mikami, Y., et al., *Macrophages and Dendritic Cells Emerge in the Liver during Intestinal Inflammation and Predispose the Liver to Inflammation*. PLOS ONE, 2014. **9**(1): p. e84619.
103. Kunkel, E.J., et al., *Lymphocyte Cc Chemokine Receptor 9 and Epithelial Thymus-Expressed Chemokine (Teck) Expression Distinguish the Small Intestinal Immune Compartment*. The Journal of Experimental Medicine, 2000. **192**(5): p. 761.
104. Wurbel, M.-A., et al., *CCL25/CCR9 Interactions Regulate Large Intestinal Inflammation in a Murine Model of Acute Colitis*. PLOS ONE, 2011. **6**(1): p. e16442.
105. Trivedi, P.J., et al., *Intestinal CCL25 expression is increased in colitis and correlates with inflammatory activity*. Journal of Autoimmunity, 2016. **68**: p. 98-104.
106. Eksteen, B., et al., *Hepatic Endothelial CCL25 Mediates the Recruitment of CCR9⁺ Gut-homing Lymphocytes to the Liver in Primary Sclerosing Cholangitis*. The Journal of Experimental Medicine, 2004. **200**(11): p. 1511.
107. Jahnel, J., et al., *Impact of experimental colitis on hepatobiliary transporter expression and bile duct injury in mice*. Liver International, 2009. **29**(9): p. 1316-1325.
108. Kühn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. Cell, 1993. **75**(2): p. 263-274.
109. Boirivant, M., et al., *Oxazolone Colitis: A Murine Model of T Helper Cell Type 2 Colitis Treatable with Antibodies to Interleukin 4*. The Journal of Experimental Medicine, 1998. **188**(10): p. 1929-1939.
110. Tarlton, N.J., et al., *Plasmablast frequency and trafficking receptor expression are altered in pediatric ulcerative colitis*. Inflammatory Bowel Diseases, 2012. **18**(12): p. 2381-2391.
111. Moro-Sibilot, L., et al., *Mouse and Human Liver Contain Immunoglobulin A-Secreting Cells Originating From Peyer's Patches and Directed Against Intestinal Antigens*. Gastroenterology, 2016. **151**(2): p. 311-323.
112. Rao, R., *Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease*. Hepatology, 2009. **50**(2): p. 638-644.
113. Henriksen, E.K.K., et al., *Gut and liver T-cells of common clonal origin in primary sclerosing cholangitis-inflammatory bowel disease*. Journal of Hepatology, 2017. **66**(1): p. 116-122.
114. Duerr, R.H., et al., *A Genome-Wide Association Study Identifies *IL23R* as an Inflammatory Bowel Disease Gene*. Science, 2006. **314**(5804): p. 1461-1463.
115. Aranda, R., et al., *Analysis of intestinal lymphocytes in mouse colitis mediated by transfer of CD4⁺, CD45RB^{high} T cells to SCID recipients*. The Journal of Immunology, 1997. **158**(7): p. 3464-3473.

116. Raczynski, A.R., et al., *Enteric Infection with Citrobacter rodentium Induces Coagulative Liver Necrosis and Hepatic Inflammation Prior to Peak Infection and Colonic Disease*. PLOS ONE, 2012. **7**(3): p. e33099.
117. Axelsson, L.-G., et al., *Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: Effects in CD4⁺-cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice*. Inflammation Research, 1996. **45**(4): p. 181-191.
118. Sebastian D. Fugmann, A.I.L., Penny E. Shockett, Isabelle J. Villey, and David G. Schatz, *The RAG Proteins and V(D)J Recombination: Complexes, Ends, and Transposition*. Annual Review of Immunology, 2000. **18**(1): p. 495-527.
119. Murphy, T.J., et al., *CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Control Innate Immune Reactivity after Injury*. The Journal of Immunology, 2005. **174**(5): p. 2957-2963.
120. Van den Steen, P.E., et al., *Carboxyterminal cleavage of the chemokines MIG and IP-10 by gelatinase B and neutrophil collagenase*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **310**(3): p. 889-896.
121. Siller-López, F., et al., *Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis*. Gastroenterology, 2004. **126**(4): p. 1122-1133.
122. Folgueras, A.R., et al., *Collagenase-2 Deficiency or Inhibition Impairs Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(14): p. 9465-9474.
123. De Minicis, S., et al., *Dysbiosis contributes to fibrogenesis in the course of chronic liver injury in mice*. Hepatology, 2014. **59**(5): p. 1738-1749.
124. Tabibian, J.H., et al., *Absence of the intestinal microbiota exacerbates hepatobiliary disease in a murine model of primary sclerosing cholangitis*. Hepatology, 2016. **63**(1): p. 185-196.
125. Kruis, W., et al., *Altered Fecal Bile Acid Pattern in Patients with Inflammatory Bowel Disease*. Digestion, 1986. **35**(4): p. 189-198.
126. Buffie, C.G., et al., *Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to Clostridium difficile*. Nature, 2015. **517**(7533): p. 205-208.
127. Weingarden, A.R., et al., *Microbiota transplantation restores normal fecal bile acid composition in recurrent Clostridium difficile infection*. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, 2014. **306**(4): p. G310-G319.
128. Van Nieuwkerk, C.M., et al., *Effects of Ursodeoxycholate and cholate feeding on liver disease in FVB mice with a disrupted mdr2 P-glycoprotein gene*. Gastroenterology, 1996. **111**(1): p. 165-171.
129. Yoshikawa, M., et al., *Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immune responses*. Hepatology, 1992. **16**(2): p. 358-364.
130. Sayin, Sama I., et al., *Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-beta-muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist*. Cell Metabolism, 2013. **17**(2): p. 225-235.
131. Merrell, M.D., et al., *Selective and Cytokine-Dependent Regulation of Hepatic Transporters and Bile Acid Homeostasis during Infectious Colitis in Mice*. Drug Metabolism and Disposition, 2014. **42**(4): p. 596-602.
132. Rau, M., et al., *Alterations in Enterohepatic Fgf15 Signaling and Changes in Bile Acid Composition Depend on Localization of Murine Intestinal Inflammation*. Inflammatory Bowel Diseases, 2016. **22**(10): p. 2382-2389.
133. Hernández-Chirlaque, C., et al., *Germ-free and Antibiotic-treated Mice are Highly Susceptible to Epithelial Injury in DSS Colitis*. Journal of Crohn's and Colitis, 2016. **10**(11): p. 1324-1335.

134. Ravikumar, R., et al., *Risk factors for recurrent primary sclerosing cholangitis after liver transplantation*. Journal of Hepatology, 2015. **63**(5): p. 1139-1146.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen all denjenigen Menschen zu danken, die mich während meiner Dissertation tatkräftig unterstützt haben.

Zunächst gilt mein besonderer Dank Prof Samuel Huber für die Bereitstellung des Themas sowie den Freiraum das Projekt selbständig zu entwickeln und voranzutreiben. Mein weiterer Dank gilt der gesamten AG-Huber für die freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich an dieser Stelle Tanja Bedke für die konstruktiven Hilfestellungen beginnend beim Versuchsdesign, über die Versuchsdurchführung bishin zur Auswertung und schließlich für die hilfreichen Korrekturvorschläge. Außerdem Danke ich Dörte Kleinschmidt, Penelope Pelczar, Anastasios Giannou und Sandra Wende für die tatkräftige Unterstützung immer dann wenn helfende Hände gebraucht wurden. Leonie Brockmann danke ich für die Hilfestellung in der Durchflusszytometrie. Laura Garcia Perez möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche mit *Citrobacter rodentium* Infektionen danken. Francis Jessica Huber danke ich für die vielen organisatorischen Durchführungen die vor allem im Hintergrund liefen.

Für die spannenden wissenschaftlichen Diskussionen und die Motivation zur Durchführung weiterer Versuche danke ich Prof. Nicola Gagliani.

Für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg des SFB 841 mit seinem gesamten wissenschaftlichen Angebot danke ich Prof Giesa Tiegs und Prof Ansgar W. Lohse.

Schließlich danke ich noch Prof. Christoph Schramm und Prof. Johannes Herkel für das Mitwirken in meiner Betreuungskommission und die zusätzlichen wissenschaftlichen Anregungen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Partnerin Anna-Lena, die mich jederzeit unterstützt hat und mir die Freiräume für die Durchführung der zeitaufwendigen Versuche eingeräumt hat.

Außerdem danke ich meinen Eltern, die meine Entscheidungen stets mitgetragen haben und ohne deren Hilfe meine Studium in dieser Form sicher nicht möglich gewesen wäre.

10 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

11 Eidesstattliche Erklärung

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

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

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