

Aus dem Biochemischen Institut
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Stefan Rose-John
der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel

**Funktionelle Charakterisierung von sgp130 als Regulator
von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Darmkarzinogenese**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel

verlegt von
DR. MICHAEL BADKE
aus Bonn

Kiel (2016)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rose John (Biochemisches Institut)
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Schreiber (Klinik für Innere Medizin I)

Tage der mündlichen Prüfung: 03.05.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel den 03.05.2018

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Roider

1 Einleitung	
1.1 Interleukin 6 , seine Signalwege und deren Wirkungen	5
1.2 Die Schlüsselstellung von IL-6 im Entzündungsgeschehen der CED und CAD	
1.2.1 Allgemeine Pathologie der CED und CAD	9
1.2.2 Die besondere Rolle von IL-6 in der Darmentzündung und –karzinogenese	
1.2.2.1 IL-6 in der Chronifizierung entzündlicher Darmerkrankungen	10
1.2.2.2 IL-6 in der Regeneration von Darmepithel und Wundheilung	11
1.2.2.3 IL-6 in der mit Entzündung assoziierten Darmkarzinogenese	12
1.3 Die Blockade von IL-6 als Therapieoption für CED und CAD	
1.3.1 Allgemeine Immunsuppression und TNF-Blockade als therapeutische Basis	12
1.3.2 Möglichkeiten der Blockade von IL-6 als Therapieansatz für CED und CAD	
1.3.2.1 Die Blockade der Produktion und Sekretion von IL-6	13
1.3.2.2 Die Blockade der Signalwege von IL-6	14
1.3.3 Die selektive Blockade des Transsignalings von IL-6 mit sgp130Fc	17
1.4 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Methoden	
2.1 Verwendete Maustypen	19
2.2 Das DSS-Colitis-Modell	20
2.3 Das DSS-AOM-Krebs-Modell	21
2.4 Histologische Analyse	
2.4.1 Anfertigung und Färbung von Kolonrollen	22
2.4.2 Qualitative und quantitative Analyse der Histologie	23
2.5 Analyse von Immunzellen der Lamina propria mittels Durchflusszytometrie	25
2.6 Statistische Methoden	28
3 Ergebnisse	
3.1 Wirkung von sgp130Fc bei transgenen Mäusen und Injektion im Vergleich zu C57BL/6N Wildtypen im Rahmen der DSS-Colitis	
3.1.1 Übersicht über die Versuchsreihen	29
3.1.2 Klinische Unterschiede von transgenem zu injiziertem sgp130Fc im Vergleich zum Wildtyp im Entzündungsverlauf	
3.1.2.1 Langzeitbetrachtung inklusive Regeneration	30
3.1.2.2 Betrachtung der Frühphase der DSS-Colitis	32
3.1.3 Histologische Veränderungen in der DSS-Colitis	
3.1.3.1 Vergleich zum Zeitpunkt der frühen und späten Regeneration	36
3.1.3.2 Vergleich in der aktiven Entzündungsphase	37
3.1.4 Entwicklung von Granulozyten, Makrophagen und T-Zellen auf Basis einer Analyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie	41
3.1.5 Zusammenfassung	47

3.2 Vergleich von transgenen sgp130Fc-Mäusen und C57BL/6N-Wildtypen im DSS-AOM-Modell der Karzinogenese	
3.2.1 Übersicht der Versuchsreihen	48
3.2.2 Der Entzündungsverlauf unter DSS im Rahmen der Karzinogenese	50
3.2.3 Ergebnisse der Karzinogenese	51
3.2.4 Zusammenfassung	54
4 Diskussion	
4.1 Einschränkungen des Aussagegehalts vorliegender Ergebnisse	55
4.2 Die besondere Rolle des Mikrobioms des Darms in der CED	56
4.3 Selektive IL-6 Blockade zur Reduktion von Infektionen im Rahmen der CED-Therapie	58
4.4 Metabolische Auswirkungen der Blockade von TNF α und IL-6	59
4.5 Mögliche Perspektiven von sgp130Fc in der Behandlung von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	60
5 Zusammenfassung	62
Anhang	
Prävalenz, Inzidenz und wirtschaftliche Dimension der chronisch entzündlichen Darmerkrankung	65
CDAI – Crohn Disease-Activity Index	66
Bestehende medikamentöse Therapien der chronisch entzündlichen Darmerkrankung	
medikamentöse Therapieempfehlung für Morbus Crohn im Überblick	67
medikamentöse Therapieempfehlung für Colitis ulcerosa im Überblick	68
Übergreifende Problematik der aktuellen medikamentösen Therapie	69
Beispiele und Problematik des Histologie-Scores von Rachmilewitz:	71
DAI – Disease-Activity-Index nach Siegmund	72
Kolonentnahmen im Rahmen der Versuchsreihen DSS-AOM-2 und DSS-AOM-3	73
Abbildungsverzeichnis	74
Tabellenverzeichnis	75
Liste wesentlicher verwendeter Materialien und Geräte :	76
Abkürzungsverzeichnis	77
Literaturverzeichnis	78
Danksagung	89
Lebenslauf	90

1. Einleitung

Das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) ist seit Langem bekannt als einer der Schlüsselmediatoren in diversen chronischen Entzündungskrankheiten, wie der rheumatoiden Arthritis, (Hermann, Fleischer et al. 1989; Madhok, Crilly et al. 1993; De Benedetti, Massa et al. 1994; Polgar, Brozik et al. 2000; Nowell, Richards et al. 2003), Asthma, den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Hyams, Fitzgerald et al. 1993; Atreya, Mudter et al. 2000; Podolsky 2002; Shanahan 2002; MacDonald 2003; Xavier and Podolsky 2007) Atherosklerose, der Castleman-Krankheit (Yoshizaki, Matsuda et al. 1989), mesangialer Glomerulonephritis, Fieber, Sepsis (Waage, Brandtzaeg et al. 1989; Barkhausen, Tschernig et al. 2011) sowie der Darmkarzinogenese (Becker, Fantini et al. 2005; Grivennikov and Karin 2008; Grivennikov, Karin et al. 2009). Aber auch für die Akute-Phase-Reaktion in der Leber spielt IL-6 eine herausragende Rolle (Bode, Albrecht et al. 2012). Gleichzeitig ist IL-6 aber auch unter physiologischen, nicht entzündlichen Bedingungen wichtig für Differenzierung, Homöostase und Wachstum einer Reihe von Zellen wie Lymphozyten, Endothelzellen, hepatischen Vorläuferzellen oder neuronalen Zellen (Peters, Muller et al. 1998; Takeda, Kaisho et al. 1998). Gerade die herausragende Stellung in pro- wie anti-entzündlichen Prozessen macht IL-6 und seine Blockade zu einem attraktiven therapeutischen Ziel und damit zum Mittelpunkt einer Vielzahl wissenschaftlicher und klinischer Studien (Jones, Scheller et al. 2011; Galun and Rose-John 2013).

Die chronisch entzündliche Darmerkrankung (CED) beinhaltet mehrere Krankheitsbilder, deren gemeinsames Merkmal eine überschießende Aktivität des Immunsystems ist.¹ Eine solche chronische Entzündung des Darms geht bei einer Colitis assoziierten Darmkrebsentwicklung (CAD) der Krebsentwicklung voraus. Durch den vielfältigen Einfluss von IL-6 auf Zellen des Immunsystems kommt diesem Zytokin gerade im Entzündungsablauf der CED eine besondere Bedeutung zu.

Die überschießende Aktivität des Immunsystems kann sich genetisch bedingt oder unter dem Einfluss bestimmter Umweltfaktoren entwickeln (Ferguson, Shelling et al. 2007). Der lebenslange Verlauf der beiden Ausprägungen der CED, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, führt dabei für den Patienten zu erheblichen Belastungen in Form von Krankheitsschüben, die durch abdominale Schmerzen, nicht-blutige Diarrhöen, rektale Blutungen, Gewichtsverlust und Fieber geprägt sein können. Abhängig vom Krankheitszustand zeigen zudem ca. 15% aller Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen schwere depressive Symptome (Bokemeyer, Hardt et al. 2013).

In den aktuellen Therapieempfehlungen der S3-Leitlinien für chronisch entzündliche Darmerkrankungen stehen derzeit jene Medikamente im Vordergrund, die eine breite immunsuppressive Wirkung und entsprechende Nebenwirkungen entfalten. Darüber hinaus werden Biologika, also genetisch hergestellte

¹ Die Prävalenz, Inzidenz und erhebliche wirtschaftlichen Dimension der chronischen Darmerkrankungen wird in einem separaten Anhang dargestellt.

Proteine, insbesondere Hemmstoffe des Tumornekrosefaktors (TNF α), der an der Regulierung der Zellaktivität des Immunsystems mitwirkt, empfohlen.²

Nun liegt es nahe, eine Blockade von IL-6, wie sie mit Tocilizumab als Therapie im Rahmen der rheumatoiden Arthritis etabliert ist, auch auf die Behandlung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu übertragen.³ Eine komplette Blockade von IL-6, wie sie beispielsweise durch Tocilizumab erfolgt, führt aber neben der beabsichtigten Entzündungshemmung unter anderem zu einer eingeschränkten Regeneration des Darmepithels und der Wundheilung und damit zu erheblichen Schäden an der Darmoberfläche bis hin zur Perforation (Grivennikov, Karin et al. 2009; Schiff, Kremer et al. 2011; Tanaka, Narazaki et al. 2012; Kuhn, Manieri et al. 2014). Daher ist Tocilizumab gerade für die Behandlung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nicht zugelassen. Folglich stellt sich die Frage, ob nicht eine selektive Blockade der proinflammatorischen Wirkungen von IL-6 eine gezielte Behandlung der Entzündungsprozesse ermöglicht, ohne die antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-6 unter anderem im Rahmen der Regeneration des Darmepithels und der Wundheilung einzuschränken.

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst IL-6 mit seinen Rezeptoren und Signalwegen sowie deren Wirkungsweise dargestellt. Anschließend folgt ein kurzer Überblick über die allgemeine Pathologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankung und die besondere Rolle von IL-6 in der Chronifizierung entzündlicher Darmerkrankungen, der Regeneration des Darmepithels und der Colitis assoziierten Darmkarzinogenese. Im Anschluss werden die unterschiedlichen Möglichkeiten zur Blockade von IL-6 diskutiert und die selektive Blockade von IL-6 als potentiell besserer Therapieansatz für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und den Colitis assoziierten Darmkrebs dargestellt.

Im Folgenden werden dann im Rahmen eines Colitis- und eines Krebs-Colitis-Modells die Auswirkungen einer selektiven Blockade von IL-6 untersucht und die Ergebnisse hinsichtlich ihres Aussagegehalts diskutiert. Zum Abschluss wird der Therapieansatz der selektiven IL-6-Blockade für die Behandlung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, speziell im Hinblick auf Infektionsrisiko und metabolische Nebenwirkungen, mit den etablierten Therapieansätzen verglichen.

² Auf TNF α -Blocker entfallen bei Morbus Crohn ca. 58% bzw. bei Colitis ulcerosa 30% der direkten medizinischen Gesamtkosten, wenn gleich nur 8,2% bzw. 2,5% aller Morbus Crohn- bzw. Colitis ulcerosa-Patienten einen TNF α -Blocker einsetzen (Prenzler, Mittendorf et al. 2009; Prenzler, Bokemeyer et al. 2010; Prenzler, Bokemeyer et al. 2011).

³ Eine solche Übertragung einer erfolgreichen Therapie von einem anderen Entzündungsgeschehen auf die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigt jedoch eventuell gegenteilige Effekte. So führte zum Beispiel die Anwendung von humanen IL-17 Antikörpern, wie sie in der Behandlung von Psoriasis etabliert ist, bei Patienten mit Morbus Crohn zu einer Verschlechterung der Krankheit (Hueber, Sands et al. 2012).

1.1 IL-6, seine Signalwege und deren Wirkungen

Das Zytokin IL-6 gehört als pleiotropisches Zytokin (neben LIF, OSM, CNTF, CT-1, CLC-1, NP, IL-11, IL27 und IL-31) zur Familie der Zytokine, die (mit Ausnahme von IL-31) mit Hilfe des Glykoproteins 130 (gp130) ihre Wirkung entfalten. Hierfür bindet IL-6 zunächst an einen Rezeptor (IL-6R bzw. CD126, gp80 – Molekulargewicht 80 kDa)). Dieser Komplex (IL-6/IL-6R) bildet wiederum mit zwei Signalmolekülen gp130 (Molekulargewicht 130 kDa) einen weiteren Komplex, durch den im Verlauf intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden.

IL-6R ist in seiner membrangebundenen Form (mIL-6R) im Gegensatz zu gp130 auf wenige Zelltypen beschränkt. Der Signalweg über mIL-6R wird als klassisches Signaling bezeichnet und spielt eine wesentliche Rolle in antiinflammatorischen Prozessen wie der Induktion von Akute-Phase Proteinen, der Regeneration von Intestinalepithel bzw. der Hemmung von Epithelapoptose, der Regulierung der Homöostase von Glukose sowie der Kontrolle bakterieller Infektionen (Scheller, Chalaris et al. 2011).

Daneben kommt der IL-6-Rezeptor auch in einer löslichen Form (sIL-6R) vor. Dieser lösliche Rezeptor entsteht entweder durch alternatives Spleißen oder direkte proteolytische Abtrennung (shedding) der membrangebundenen Variante (Mullberg, Schooltink et al. 1993). IL-6, gebunden an sIL-6R, kann nun an den Zellen Wirkung entfalten, die das Glykoprotein gp130, nicht aber IL-6R auf ihrer Membran exprimieren, was den Wirkungsspielraum von IL-6 deutlich erweitert. Die Signalkaskade über IL-6/sIL-6R/gp130 wird als Transsignaling bezeichnet und hat im Rahmen der Aktivierung des Immunsystems proinflammatorischen Charakter, wie die Rekrutierung von mononuklearen Zellen, die Hemmung der T-Zell-Apoptose oder die Reduktion der T-Zelldifferenzierung zu regulatorischen T-Zellen (Scheller, Chalaris et al. 2011; Yamamoto and Rose-John 2012) (Abb. 1).

Physiologisch liegt IL-6 mit einer Konzentration von 2-6 pg/ml im Blut nahe an der Nachweisgrenze, sein löslicher Rezeptor ist mit 40 - 75 ng/ml bzw. sgp130 mit 250-400 ng/ml etwa 10.000 mal höher konzentriert. Ohne eine Entzündung wird sich also im Blut befindliches IL-6 an seinen löslichen Rezeptor binden und dann über die Bindung zu sgp130 neutralisiert (Rose-John 2012). Es verbleibt folglich für IL-6 im Wesentlichen hier nur eine parakrine Wirkungsweise (Scheller, Chalaris et al. 2011).

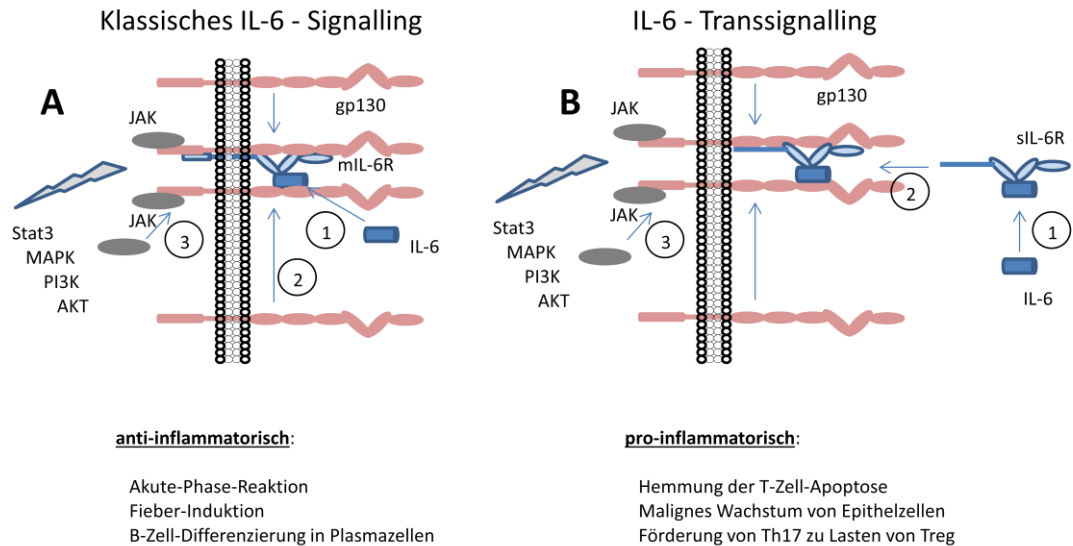


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Signalwege von IL-6:

- (A) Das sogenannte klassische Signaling von IL-6 besteht (1) in der Bindung von IL-6 an seinen membrangebundenen Rezeptor mIL-6R und (2) in der anschließenden Dimerisierung mit gp130, der (3) dadurch erfolgenden Rekrutierung der Januskinasen, wodurch im weiteren Verlauf intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden.
- (B) Beim Transsignaling erfolgt (1) die Bindung von IL-6 an seinen löslichen Rezeptor sIL-6R und dieser Komplex bindet nun (2) an die membranständigen gp130-Moleküle mit (3) darauf folgender Rekrutierung von Januskinasen, wodurch wiederum im weiteren Verlauf intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden. Klassisches Signaling ist Bestandteil anti-inflammatorischer Prozesse, während Transsignaling pro-inflammatorischen Charakter hat (Chalaris, Scheller et al. 2011)

Im Rahmen einer Entzündung erhöhen sich die Konzentrationen vom sIL-6R und sgp130 um den Faktor 2-5, jedoch von IL-6 bei chronischen Entzündungen um einen Faktor 1.000 (im Rahmen einer Sepsis bis zu 1.000.000), sodass nun eine systemische Wirkungsweise als Transsignaling möglich wird (Rose-John 2012) (Abb. 2).

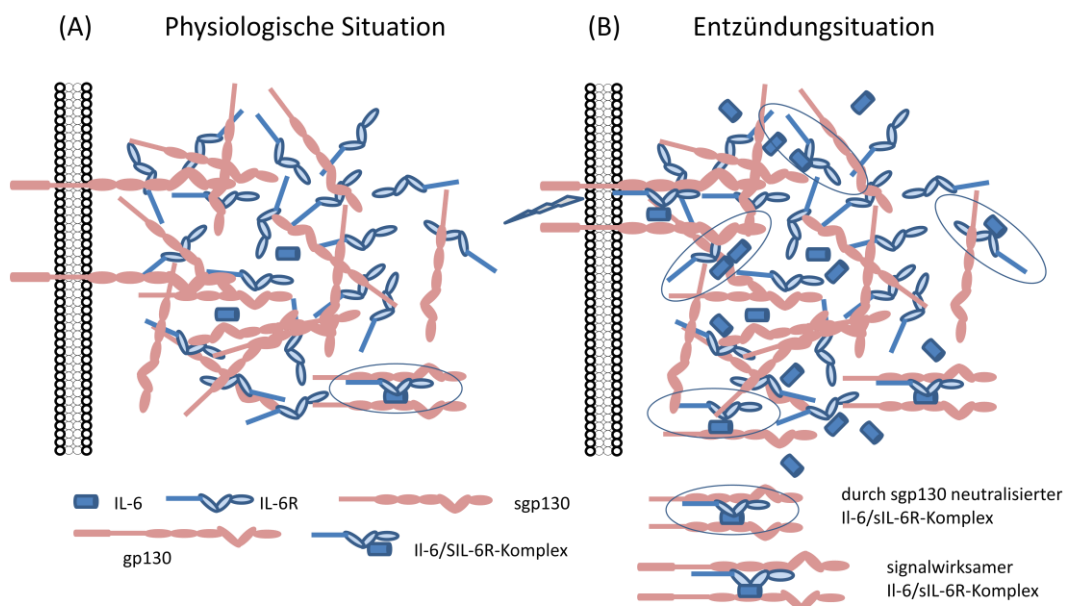


Abb.2 : IL-6, IL-6R und sgp130 – Konzentration vor und während einer Entzündungssituation:

- (A) Physiologisch liegt die Konzentration von IL-6 deutlich unter der vom löslichen IL-6R und gp130, sodaß jedes IL-6-Molekül an einen löslichen Rezeptor bindet und über lösliches gp130 neutralisiert wird – nur parakrines Signaling ist möglich.
- (B) In einer Entzündungssituation steigt die IL-6-Konzentration erheblich stärker an als die von sIL-6R und sgp130, sodaß nun viele IL-6/sIL-6R-Komplexe ihren Weg zum membranständigen gp130 finden – Transsignaling wird möglich.

1.2 Die Schlüsselstellung von IL-6 im Entzündungsgeschehen der CED und CAD

1.2.1 Allgemeine Pathologie der CED und CAD

Bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen handelt es sich um ein multifaktorielles Krankheitsgeschehen (Abb. 3). Hierbei führt das Zusammenspiel von genetischen sowie umweltbedingten Faktoren zu einem gestörten intestinalen Immunsystem und damit letztlich zu einer chronisch überschießenden Immunantwort gegenüber der intestinalen Flora.

Wie im Tiermodell gezeigt werden konnte, ist einer von mehreren auslösenden Faktoren eine unzureichende Barrierefunktion des Darmepithels: Die damit verbundene bakterielle Translokation führt zu einer reaktiven Schleimhautentzündung, die wiederum die entzündlichen Barrieredefekte verstärkt. Ein sich selbst verstärkender Prozess mit einer andauernden Stimulation des intestinalen Immunsystems entsteht (Bouma and Strober 2003; Schreiber, Rosenstiel et al. 2005).

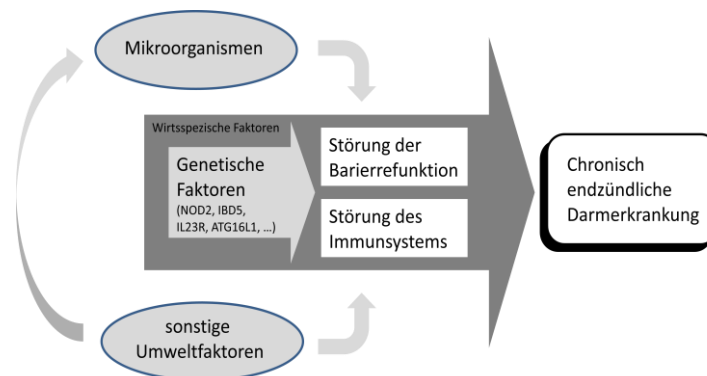


Abb. 3: vereinfachte Darstellung des multifaktoriellen Krankheitsgeschehens der chronisch entzündlichen Darmerkrankung

Im Rahmen von Screening-Untersuchungen über das gesamte Genom konnten diverse Genvarianten identifiziert werden, die als Risikofaktor bzgl. der Krankheitsanfälligkeit für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen angesehen werden können. Diese Varianten betreffen unterschiedliche Komponenten des Immunsystems, wie NOD2⁴, und führen zu pathologischen Reaktionen auf luminaire Bakterien im Darm, wobei die Relevanz der gefundenen Polymorphismen sich für die beiden Ausprägungen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, durchaus unterscheiden (Hampe, Frenzel et al. 2002; Hampe, Franke et al. 2007; Parkes, Barrett et al. 2007; Xavier and Podolsky 2007; Franke, Balschun et al. 2008; Kaser, Lee et al. 2008; Billmann-Born, Till et al. 2011; Couturier-Maillard, Secher et al. 2013). Die damit verbundene Erblichkeit von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa konnte auch in Zwillingsstudien nachgewiesen werden (Spehlmann, Begun et al. 2008).

⁴ Das Protein NOD2 ist ein sogenannter Pattern-Recognition-Rezeptor für Fremdstoffe im angeborenen Immunsystem.

Zusätzlich können eine Vielzahl von Umweltfaktoren die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auslösen und verstärken. Westliche Ernährungsgewohnheiten, erhöhte Medikamenteneinnahme und Hygienestandards beeinflussen in erhöhtem Maße das Mikrobiom des Darms und tragen so zu einer Häufung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in der westlichen Welt bei.⁵

Neben diesen Erklärungsansätzen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen steht eine gestörte Regulation der physiologischen Immunantwort gegen luminale Bakterien und ihrer Bestandteile im Sinne einer fehlenden Toleranzentwicklung im Vordergrund der aktuelleren Forschung. Am Beginn jeder Immunantwort steht die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten. Angelockt durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) wandern sie aus den Blutgefäßen in die Mukosa ein und setzen dort antimikrobielle Peptide und reaktive Sauerstoffspezies frei. Diese schädigen unspezifisch sowohl potentielle Krankheitserreger als auch das umliegende Gewebe. Zusätzlich aktivieren sie durch Sezernierung von Zytokinen wie dem Tumornekrosefaktor (TNF α), Interleukinen (IL-1 β , IL-6) und dem Chemokin IL-8, die Leukozyten, insbesondere Makrophagen. Die Makrophagen können nun durch verschiedene proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12, dem Chemokin IL-8 und INF γ eine unterschiedliche Differenzierung der T-Zellen auslösen. Hierbei kann man eine zelluläre und eine humorale Immunantwort unterscheiden.

Bei Morbus Crohn erfolgt eine zelluläre Immunantwort durch eine T-Zelldifferenzierung zum Typ 1 (Th1). Diese Th1-Zellen scheiden Botenstoffe wie Interleukin-2 (IL-2) und Interferon-Gamma (INF γ) aus, wobei IL-2 die Differenzierung von nativen T-Zellen zu Th1-Zellen verstärkt und im Zusammenspiel mit INF γ Effektorzellen wie Makrophagen rekrutiert, die die Erreger vernichten. Daneben führt hier eine erhöhte Produktion von IL-12 durch die angelockten Makrophagen zu einer forcierten Reifung von Th1-Zellen. Diese Th1-Zellen produzieren wiederum die in diesem Zusammenhang proinflammatorischen Zytokine INF γ , TNF α , IL-1 β , IL-2 und auch IL-6, welche dann durch Freisetzung und Aktivierung von Metalloproteasen zur Gewebeerstörung beitragen (Hendrickson, Gokhale et al. 2002).⁶ Ein hoher Stellenwert innerhalb der proinflammatorischen Zytokine kommt dabei neben IL-6 auch TNF α zu. TNF α aktiviert zum einen Matrixmetalloproteasen, trägt aber auch durch vermehrte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und der damit verbundenen Reduktion der Apoptoserate zu einer Verschlimmerung der Colitis bei (Holtmann, Douni et al. 2002). TNF α ist daher auch ein erfolgreicher Angriffspunkt in der Therapie von Morbus Crohn.

Bei Colitis ulcerosa wird von einer humoralen Immunantwort durch T-Zelldifferenzierung zu T-Helferzellen vom Typ 2 (Th2) ausgegangen. Die Th2-Zellen produzieren unter anderem Botenstoffe (hier atypischer Weise IL-5, IL-10, IL-6 und IL-13), durch die B-Lymphozyten aktiviert werden, um spezifische Antikörper gegen die jeweiligen Antigene zu produzieren. Diese Antikörper binden an die Antigene,

⁵ Die besondere Bedeutung des Mikrobioms des Darms für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte in einer Vielzahl von Studien bestätigt werden. (Rath, Schultz et al. 2001; Elson, Cong et al. 2005). Der Einsatz von Probiotika zur Remissionserhaltung bei Colitis ulcerosa zeigt das protektive Potential der Darmflora (Sartor 2001; Isaacs and Sartor 2004; Sartor 2011). Auf den besonderen Einfluss des Mikrobioms auf die CED wird in Kap 4 ausführlich eingegangen.

⁶ Eine Blockade von IL-12 durch monoklonale Antikörper (IL-12/p-40 mAb) konnte daher in experimentellen Colitismodellen, in denen Th1-Zellen im Vordergrund stehen, auch eine Reduktion bzw. Remission der Colitis erzeugen (Neurath, Fuss et al. 1995).

können die Erreger so deaktivieren bzw. markieren, sodass andere Elemente des Immunsystems sie beseitigen können (Hendrickson, Gokhale et al. 2002).

Bei beiden Ausprägungen der chronisch entzündlichen Darmerkrankung handelt es sich um eine überschießende Immunantwort. (Neurath, Weigmann et al. 2002; Podolsky 2002; Bouma and Strober 2003; Fuss, Heller et al. 2004). Eine solche chronische Entzündung des Darms geht bei einer Colitis assoziierten Darmkrebsentwicklung, anders als beim kolorektalen Karzinom, der Krebsentwicklung voraus. Die chronische Entzündung kann über oxidative Schäden an der DNA zu p53-Mutationen in den Krebszellen und zu entzündetem, aber nicht dysplastischem Epithel führen (Kraus and Arber 2009).

Eine Schlüsselrolle im Colitis assoziierten Darmkrebs kommt der abweichend verlaufenden Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB sowie STAT3 zu (Kojima, Morisaki et al. 2004; Karin and Greten 2005; Lee, Herrmann et al. 2009)⁷. Diese innerhalb des Colitis assoziierten Darmkrebs abweichende Aktivierung von NFκB, speziell in Makrophagen und dendritischen Zellen der Lamina propria, führt zur Zytokinproduktion u.a. von TNFα, IL-6, IL-1β und IL-11, welche als Wachstumsfaktoren für prä maligne Enterozyten gesehen werden (Karin and Greten 2005). Speziell IL-6 zeigt sich hierbei als potenter Stimulator der Vermehrung von Krebszellen und des Tumorwachstums (Becker, Fantini et al. 2005).

1.2.2 Die besondere Rolle von IL-6 in der Darmentzündung und -karzinogenese

Die Konzentration von IL-6 im Serum korreliert in diversen Untersuchungen positiv mit der klinischen, endoskopischen sowie histologischen Ausprägung der Entzündungsaktivität der chronisch entzündlichen Darmerkrankung (Mudter and Neurath 2007):

- Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa und Morbus Crohn zeigten signifikant höhere Konzentrationen von sIL-6R im Blut (Mitsuyama, Toyonaga et al. 1995).
- Die Serumkonzentration von IL-6 ist ein sehr guter Marker zur Vorhersage eines Rückfalls nach Behandlung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung in Remission. Patienten mit einer Serumkonzentration von größer 20 pg/ml hatten ein 17-fach höheres Risiko für einen erneuten Schub einer inaktiven chronischen Darmerkrankung innerhalb eines Jahres (Louis, Belaiche et al. 1997) .
- Es existiert ein positiver Zusammenhang zwischen einer höheren IL-6-Konzentration im Serum und der Häufigkeit der Rückfälle (Van Kemseke, Belaiche et al. 2000).⁸

⁷ Diese abweichend verlaufenden Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB sowie STAT3 wird auch für das schlechtere Ansprechen von Chemotherapie und Bestrahlung bei dem Colitis assoziierten Darmkrebs verantwortlich gemacht (Wang, Mayo et al. 1996).

⁸ So konnte in einer Studie mit 136 Patienten die Wirksamkeit von IL-6 als Marker zur Überwachung der Wirksamkeit der Kortisontherapie (im Sinne einer Senkung des Crohn Disease Activity Index (CDAI) - siehe Anhang) als auch als Prognoseparameter für einen Rückfall nach Remission bestätigt werden (Reinisch, Gasche et al. 1999).

1.2.2.1 IL-6 in der Chronifizierung entzündlicher Darmerkrankungen

In der akuten Entzündungsphase werden die gewebeeigenen mononuklearen Zellen durch die Entzündung zur Sekretion von IL-1 β , IL-6 und TNF α angeregt, welche wiederum die Epithelzellen zur Sekretion von CXC-Chemokinen veranlassen. Dies führt zu einer Migration von neutrophilen Granulozyten aus dem Blut zur Entzündungsstelle. Diese Granulozyten spalten proteolytisch in ihrer Apoptose den IL-6-Rezeptor von ihrer Zelloberfläche ab. Dieser nun lösliche IL-6R ermöglicht zusammen mit IL-6 via Transsignaling die Stimulation der Epithelzellen zur Sekretion von MCP-1. Hierdurch werden Monozyten und T-Lymphozyten zum Entzündungsgeschehen gelockt (Rabe, Chalaris et al. 2008) (Abb. 4).

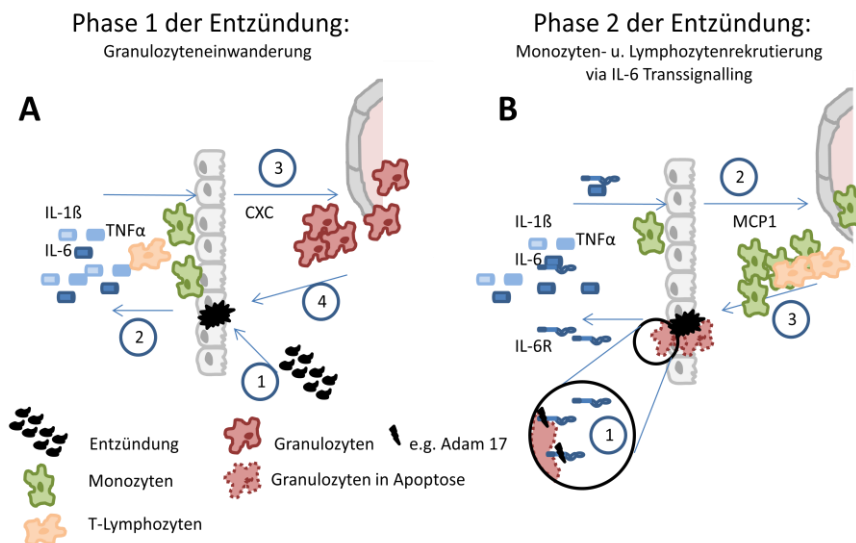


Abb. 4: Makrophagenrekretierung in der Entzündung via IL-6 Transsignaling:

- (A) In der ersten Entzündungsphase werden die gewebeeigenen mononuklearen Zellen durch die Entzündung (1) zur Sekretion von IL-1 β , IL-6 und TNF α angeregt (2), welche wiederum die Epithelzellen zur Sekretion von CXC-Chemokinen veranlassen(3), Granulozyten migrieren aus dem Blut zur Entzündungsstelle (4).
- (B) In der zweiten Phase shedden die in der Apoptose befindlichen Granulozyten von ihrer Zelloberfläche z.B. durch Adam17 den IL-6-Rezeptor. Dieser nun lösliche Rezeptor ermöglicht zusammen mit IL-6 via Transsignaling die Stimulation der Epithelzellen zur Sekretion von MCP1, welches die Monozyten und T-Lymphozyten zum Entzündungsgeschehen lockt.

Gleichzeitig induziert IL-6 über klassisches Signaling die Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber (Gauldie, Richards et al. 1992). Die angelockten Makrophagen produzieren sIL-6R, entweder durch alternatives Spleißen oder durch proteolytische Abspaltung. Der Prozess der proteolytischen Abspaltung von membrangebundenen IL-6R wird sowohl bei den Makrophagen als auch bei den Epithelzellen durch die Akute-Phase-Proteine verstärkt (Jones, Novick et al. 1999). Diese sIL-6R binden nun an IL-6 und diese Komplexe aktivieren über Transsignaling die gp130-Oberflächenmoleküle der intestinalen T-Zellen. Dies führt in den T-Zellen zur Translokation von STAT3, induziert so antiapoptotische Gene wie bcl-2 oder bcl-xr und erhöht dadurch die Widerstandsfähigkeit dieser intestinalen T-Zellen gegen Apoptose.

Darüber hinaus beeinflusst IL-6 die T-Zelldifferenzierung. In Kombination mit TGF β ist IL-6 ein Trigger für die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th17-Zellen, statt zu regulatorischen T-Zellen. Auch für diese Th17-Zellen ist obige STAT3-Kaskade, ausgelöst durch IL-6-Transsignaling, mit resultierender Apoptoseresistenz beschrieben.

Diese Apoptoseresistenz der intestinalen T-Zellen ist schließlich ein wesentlicher treibender Faktor für die chronische Entzündung (Abb. 5).

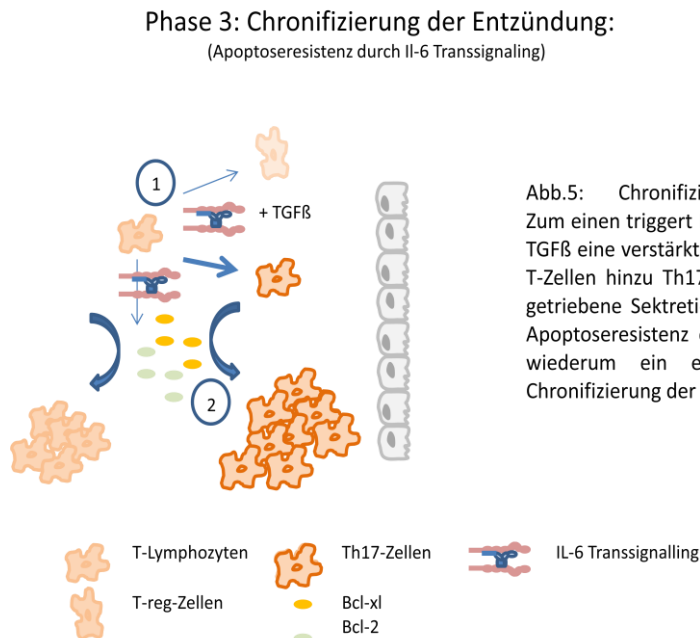


Abb.5: Chronifizierung der Entzündung durch IL-6: Zum einen triggert IL-6 zusammen in Verbindung mit TGFβ eine verstärkte Differenzierung der intestinalen T-Zellen hinzu Th17 (1), zu anderen führt die IL-6 getriebene Sekretion von Bcl-xl und Bcl-2 zu einer Apoptoseresistenz der intestinalen T-Zellen (2), die wiederum ein entscheidender Faktor für die Chronifizierung der Entzündung ist.

1.2.2.2 IL-6 in der Regeneration von Darmepithel und Wundheilung

Wie bereits ausgeführt, ist einer von mehreren auslösenden Faktoren der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine unzureichende Barrierefunktion des Darmepithels (Bouma and Strober 2003; Schreiber, Rosenstiel et al. 2005).

IL-6 zeigte im Rahmen einer experimentellen Colitis, vermittelt über das klassische Signaling via mIL-6R, eine protektive Wirkung auf das Darmepithel und führte damit zum Erhalt seiner Barrierefunktion (Grivennikov, Karin et al. 2009). Ebenso konnte in zwei Mausmodellen von Darmerkrankungen – einer Verletzung durch Biopsie sowie einer bakteriell ausgelösten Colitis – ein hierdurch erhöhter Anstieg von IL-6 unter anderem durch intraepitheliale Lymphozyten beobachtet werden. Die Blockade von IL-6 führte in diesen Modellen zu beeinträchtigter Wundheilung und verminderter Epithelproliferation (Kuhn, Manieri et al. 2014).⁹

Die globale Blockade von IL-6 kann daher, speziell bei begleitender Suppression des Immunsystems durch Kortison, die Zahl gastrointestinaler Perforationen signifikant erhöhen (Van Vollenhoven RF 2009; Campbell, Chen et al. 2011; Navarro, Taroumian et al. 2014).

⁹ Die Regeneration des Darmepithels ist speziell bei dem in dieser Arbeit verwendeten DSS-Colitis-Modell von besonderer Bedeutung. Dies zeigte sich auch in einer Studie mit Mäusen, die niedrige Konzentration von ADAM 17, einem Enzym, welches TNFα, IL-6R und EGF-R von der Zelloberfläche abspaltet, aufwiesen. Die hierdurch verringerte Aktivität von EGF-R führte zum Ausbleiben der Phosphorylierung von STAT3 und entsprechend verringerter regenerativer Proliferation des Darmepithels und einer damit verbundenen Barriestörung des Darmepithels (Chalaris, Adam et al. 2010)

1.2.2.3 IL-6 in der mit Entzündung assoziierten Darmkarzinogenese

Auch in der mit Entzündung assoziierten Darmkarzinogenese kann IL-6 als Prognosefaktor für das Tumorstaging, Größe und Metastasierungsgrad des Tumors sowie das Überleben des Patienten genutzt werden (Knupfer and Preiss 2010). Hierbei zeigen sich IL-6 mit STAT3 als die wesentlichen Mediatoren des Tumorzellwachstums:

- So konnte Becker bereits anhand des DSS-AOM-Mausmodells die Bedeutung des Transsignalings von IL-6 für das intestinale Tumorstadium in Epithelzellen aufzeigen, in dem er das Tumorstadium durch Gabe von sgp130Fc als selektive Blockade des IL-6 Transsignalings stoppte (Becker, Fantini et al. 2004).
- Grivennikov zeigte im selben Mausmodell, dass eine gentechnische Manipulation zur Deaktivierung der Gene für IL-6 zu einer Reduktion der Tumorentwicklung im Vergleich zu nicht gentechnisch veränderten Mäusen desselben Typs führt (Grivennikov, Karin et al. 2009).
- Bollrath wies eine erhöhte Tumorentwicklung bei Hyperaktivierung von STAT1 und STAT3 nach.¹⁰ Umgekehrt zeigte Bollrath, dass sich das Tumorstadium bei gentechnischer Manipulation von Mäusen, die zu einer spezifischen Auslöschung von STAT3 in ihren Epithelzellen führt, reduziert (Bollrath, Pheesse et al. 2009).

Neben dem direkten Kausalzusammenhang von IL-6 über STAT3 auf das Tumorstadium sind im DSS-AOM-Modell auch indirekte Wirkungszusammenhänge dokumentiert. Die erhöhte Expression für einen Rezeptor des Wachstumsfaktors für Gefäßendothel (VEGF), VEGFR2, kennzeichnet Colitis assoziierten Darmkrebs. Die Aktivierung dieses Rezeptors stimuliert das Tumorstadium. Waldner konnte zeigen, dass IL-6 im DSS-AOM-Mausmodell die erhöhte Expression von VEGFR2 in intestinalen Epithelzellen und so eine auto-/parakrine Feedbackschleife mit einer durch VEGFR2 abhängigen STAT3-Aktivierung ermöglicht, was zu einem forciertem Tumorstadium führt (Waldner, Wirtz et al. 2010).

1.3 Die Blockade von IL-6 als Therapieoption für CED und CAD

1.3.1 Allgemeine Immunsuppression und TNF-Blockade als therapeutische Basis

Die derzeitige Therapieempfehlung für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Deutschland ist niedergelegt in den S3-Leitlinien für Morbus Crohn von 2014 (gültig bis 2018) bzw. Colitis ulcerosa von 2011 (gültig bis 2016). In diesen Leitlinien wird jeweils eine Stufentherapie zur Behandlung der chronisch entzündlichen Darmerkrankung empfohlen, in der, abgestimmt nach dem Schweregrad der Entzündung und ihrer Ausbreitung bzw. Lokalisation, unterschiedliche Pharmazeutika zum Einsatz kommen. Neben diesen auf Immunsuppression und Entzündungsreduktion ausgerichteten Pharmakotherapien steht zusätzlich die

¹⁰ Hierfür verwendete er sogenannte gp130Y757F-Mäuse. Diese Mäuse sind durch eine mutierte gp130-Zytokinrezeptoruntereinheit gekennzeichnet, die nicht an den negativen Regulator des Zytokinsignalings, SOCS3, binden kann, woraus eine Hyperaktivierung der Signalingmoleküle STAT1 und STAT3 resultiert.

nutritive Therapie, die eine Vermeidung immunstimulierender Exposition zum Ziel hat. Als letzte Therapiestufe werden neben der chirurgischen Therapie der Einsatz von TNF α -Inhibitoren zur Blockade der intestinalen bzw. systemischen Immunantwort empfohlen. Erstes Ziel ist immer die Remissionseinleitung und deren Erhaltung. Daneben spielen aber auch die Erhöhung der Lebensqualität, die Vermeidung oder zumindest Abschwächung von extraintestinalen Manifestationen und Diarrhöe, eine Erhöhung der Leistungsfähigkeit sowie eine Reduktion der Häufigkeit von Krankenhausaufenthalten eine wichtige Rolle.

Schwerpunkt der Behandlung ist, ausgehend von einer überschießenden Immunreaktion, die Suppression des Immunsystems mit Glukokortikoiden, die, indem sie die Zellmembran durchdringen, intrazellulär mit speziellen Rezeptoren einen Komplex bilden und im Zellkern die Synthese zahlreicher Proteine beeinflussen, die den Entzündungsprozess unterhalten: Bei einer Entzündung bewirken Glukokortikoide u.a. eine Hemmung der Gewebsinfiltration von neutrophilen Granulozyten durch eine Störung ihrer Adhäsion an die Gefäßwand. Zusätzlich vermindern Glukokortikoide die Lymphozytenzahl und die Interleukinproduktion und bewirken eine deutliche Abnahme der Makrophageneinwanderung und der Bildung von Zytokinen.

Bleibt auch bei hoher Entzündungsaktivität die systemische Glukokortikoidgabe die erste Wahl, so wird jedoch bei Unwirksamkeit oder Kontraindikationen für Cortison bei Morbus Crohn der Einsatz von Immunsuppressiva, speziell Azathioprin, bzw. 6-Mercaptopurin oder als möglicher Ersatz auch Methotrexat empfohlen. Bei Colitis ulcerosa werden Calcineurin-Inhibitoren wie Ciclosporin und Tacrolimus eingesetzt, deren Wirkungsweise auf der Hemmung von Transkription und Freisetzung von Zytokinen (IL-2, TNF α , INF γ etc.) in T-Zellen beruht.

Alternativ kommen nach Abklärung einer möglichen chirurgischen Behandlungsstrategie die TNF α -Blocker (Infliximab, Adalimumab, Certolizumab sowie Golimumab) zum Einsatz, die durch Bindung an membran-gebundenes wie gelöstes TNF α die Freisetzung von proinflammatorischen Interleukinen und die Einwanderung von Leukozyten in das Gewebe hemmen. Ein primäres Therapieversagen bei TNF α -Blockern von 10-30% und ein sekundäres Versagen im Verlauf des ersten Behandlungsjahres von 30-40% (Hanauer, Feagan et al. 2002; Colombel, Sandborn et al. 2007; Schreiber, Lawrance et al. 2011) zeigt jedoch die Notwendigkeit für alternative Ansätze. Neben TNF α -Blockern ist auch der Anti-Integrin-Antikörper Vedolizumab für die therapierefraktären Colitis ulcerosa und Morbus Crohn zugelassen, der darmspezifisch die Einwanderung von aktivierten Lymphozyten blockiert und so die weitere Entzündung unterdrückt.^{11 12}

1.3.2 Möglichkeiten der Blockade von IL-6 als Therapieansatz für CED und CAD

Die Blockade von IL-6 ist ein vielversprechender Therapieansatz von Autoimmunkrankheiten wie der rheumatoiden Arthritis oder multipler Sklerose. So ist ein monoklonaler Antikörper gegen IL-6R, Tocilizumab, der zu einer globalen Blockade des IL-6-Signalweges führt, inzwischen in mehr als 90 Ländern für die

¹¹ Vedolizumab blockiert auf der Oberfläche von aktivierten Lymphozyten als monoklonaler Antikörper ein Adhäsionsmolekül ($\alpha_4 \beta_7$ -Integrin). Damit können diese Lymphozyten nicht mehr an die MAdCAM-Rezeptoren (mucosal addressin adhesion molecule) der Mukosazellen binden. Hierdurch wird die Einwanderung dieser Lymphozyten ins Gewebe blockiert und die weitere Entzündung so unterdrückt (Feagan, Rutgeerts et al. 2013; Mosli and Feagan 2013; Parikh, Fox et al. 2013).

¹² Ein detaillierter Überblick über die einzelnen Therapiekonzepte sowie Risiken, Nebenwirkungen, Kontraindikationen und den Umfang von primärem und sekundärem Versagen für die jeweiligen Therapien findet sich im Anhang. Der Einsatz von TNF α -Blockern im Vergleich zu einer selektiven Blockade von IL-6 für die Behandlung der CED wird in Kapitel 4 diskutiert.

rheumatoide Arthritis als Therapeutikum zugelassen und viele weitere IL-6 bezogenen Therapieansätze befinden sich hier in unterschiedlichen Phasen der klinischen Zulassung (Calabrese and Rose-John 2014). Auch für andere Autoimmunerkrankheiten konnten positive Wirkungen der IL-6-Blockade nachgewiesen werden (Tanaka, Narazaki et al. 2012). Derzeit befinden sich mehrere Therapeutika zur globalen oder selektiven Blockade von IL-6 für verschiedene Krankheitsbilder in der Phase 1,2 bzw. 3 der klinischen Zulassung (Jones, Scheller et al. 2011; Calabrese and Rose-John 2014).

Auch im Bereich der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und der hiermit assoziierten Darmkarzinogenese wurden und werden eine Reihe unterschiedlicher Ansätze der Blockade von IL-6 zur Krankheitslinderung bzw. -heilung verfolgt (Mudter and Neurath 2007; Jones, Scheller et al. 2011), auf die im Folgenden kurz eingegangen werden soll.

1.3.2.1 Die Blockade der Produktion bzw. Sekretion von IL-6

Auf die Bedeutung von Kortikosteroiden in den aktuellen Leitlinien zur Behandlung von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ist oben ausführlicher eingegangen worden. Ein Effekt der Steroide ist hierbei die Unterdrückung der NF- κ B abhängigen Produktion von IL-6 in den Monozyten. Einmal produziert kann aber auch die Sekretion von IL-6 durch mononukleare Zellen mit Hilfe der Gabe von Dehydroepiandrosteron (DHEA) unterbunden werden (Straub, Konecna et al. 1998). In einem Phase 2-Pilotversuch zeigte sich diese DHEA-Behandlung auch als erfolgversprechend für eine refraktäre chronisch entzündliche Darmerkrankung (Andus, Klebl et al. 2003).

1.3.2.2 Die Blockade der Signalwege von IL-6

Die Blockade der IL-6 Signalwege steht im Mittelpunkt der derzeitigen Forschung und Entwicklung der auf IL-6 ausgerichteten Therapeutika (Jones, Scheller et al. 2011). Hierbei lassen sich generell mehrere Ansätze unterscheiden: die globale Blockade des IL-6 Signalings, sei es durch globale Blockade von IL-6 oder IL-6R, die selektive Blockade des Transsignalings entweder durch Blockade von sIL-6R oder durch Blockade des löslichen IL-6/sIL-6R-Komplexes, sowie schließlich als dritte Variante eine indirekte Blockade der Wirkung von IL-6 durch Blockade der Januskinase 1 und 2¹³ (Chalaris, Schmidt-Arras et al. 2012; Seavey, Lu et al. 2012; Waetzig and Rose-John 2012) (Abb. 6):

¹³ Die Effektivität und Effizienz des Blockadeweges hängt hierbei entscheidend vom zugrundeliegenden Krankheitsgeschehen ab, durch welches festgelegt wird, ob das Transsignaling von IL-6 im Mittelpunkt des Krankheitsgeschehens steht. Eine Blockade des Transsignalings kann beispielweise auch regenerative Prozesse in der Leber stören, wie in diversen Mausmodellen gezeigt werden konnte (Waetzig and Rose-John 2012). Im Rahmen des hier betrachteten intestinalen Entzündungsgeschehens ist jedoch das IL-6-Transsignaling einer der entscheidenden Entzündungsmechanismen, sowohl für die akute Entzündung, als auch für die Chronifizierung und potentielle Karzinogenese im Rahmen der Colitis ulcerosa.

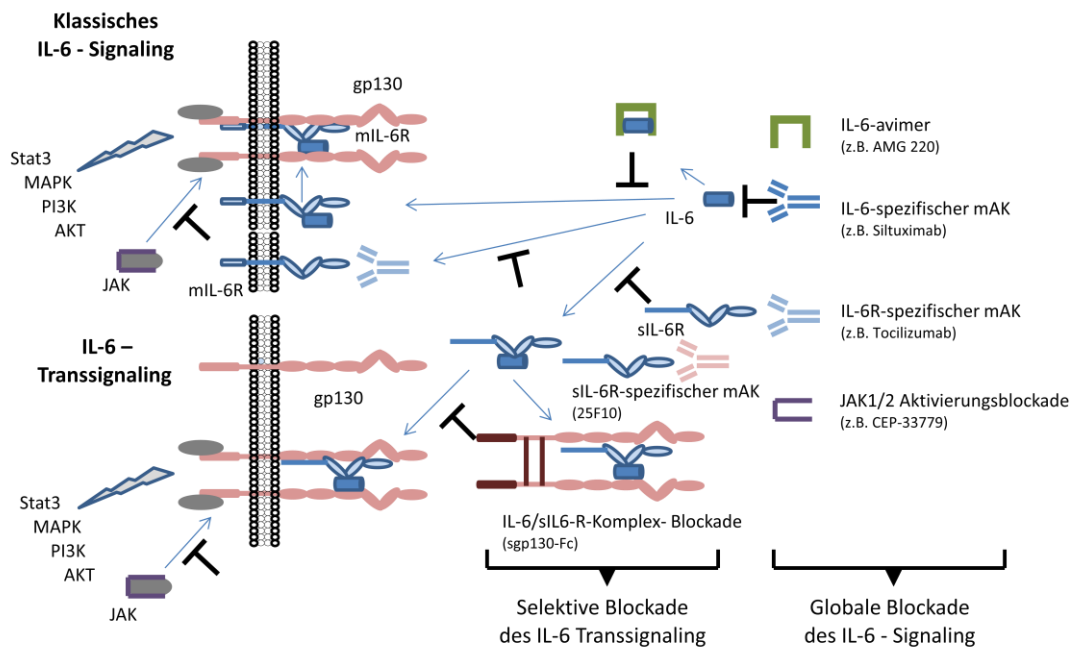


Abb. 6: Möglichkeiten der IL-6 Blockade:

Während eine direkte Blockade von IL-6 bzw. IL-6R bzw. der Aktivierung der Januskinase 1 bzw. 2 zu einer globalen Blockade des IL-6 Signalings und damit auch der Hemmung der anti-inflammatorischen Wirkung des klassischen Signaling führt, erreicht sgp130Fc durch Neutralisierung des löslichen IL-6/IL-6R-Komplexes ausschließlich eine Hemmung des Transsignaling und seiner pro-inflammatorischen Wirkung

Die direkte Blockade von IL-6 durch monokleare Antikörper (mAbs) wie Siltuximab ist ein mehrfach verfolgter Ansatz für eine Reihe von Autoimmunkrankheiten. Die entsprechenden Therapeutika befinden sich derzeit in den klinischen Phasen 1, 2 und 3. Eine direkte Blockade von IL-6 durch entsprechende mAbs zeigte zunächst auch eine gute Antitumor-Wirkung bei Normalisierung der Akute-Phase-Antwort. Im Folgenden ist jedoch ein deutlicher Anstieg von systemischem IL-6 zu beobachten, da einmal an einen Antikörper gebundenes IL-6 nicht abgebaut wird und somit im Körper akkumuliert (Yamamoto and Rose-John 2012).

Neben der direkten IL-6-Blockade steht die Blockade seines Rezeptors im Hauptfokus therapeutischer Anwendungen. Eine herausragende Rolle spielt hier, wie bereits erwähnt, der IL-6R-Blocker Tocilizumab. Neben der rheumatoiden Arthritis liegen auch Ergebnisse einer Therapie mit Tocilizumab für die Castleman'sche Krankheit, systemischen Lupus erythematoses, systemische Sklerose, Polymyositis, Riesenzellarthritis, multiple Sklerose und eine Reihe weiterer Krankheiten vor (Tanaka, Narazaki et al. 2012).

Im Mausmodell führte die Applikation des Anti-IL-6R-Antikörpers zu einer Blockade der Leukozytenrekretion und förderte die T-Zell-Apoptose (Ito, Hirotsu et al. 2002).

Die derzeit einzige klinische Pilotstudie bestand aus 36 Patienten mit aktivem Morbus Crohn¹⁴ (CDAI>150), die zweimal pro Woche intravenös (8mg/kg KG) Tocilizumab respektive ein Placebo erhielten (Ito, Takazoe et al.

¹⁴ Der Aktivitätsgrad der Erkrankung wird gemessen mit Hilfe des Crohn-Disease-Activity-Index (CDAI), der 8 Faktoren berücksichtigt, um die verschiedenen Symptome der Krankheit in ihrem Ausmaß quantitativ zu bewerten. Eine ausführliche Darstellung befindet sich im Anhang.

2004; Ito 2005) . 80% der Crohn-Patienten (8 von 10) zeigten eine klinische Reaktion im Vergleich zu 31% (4 von 13) in der Placebo-Gruppe. Ein endoskopisches wie histologisches Scoring zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen der Gruppe mit Tocilizumab-Behandlung und der Placebo-Gruppe.

Während die Behandlung beispielsweise mit Infliximab - also die Blockade des TNF-Signalwegs - zu einer signifikanten Reduktion der Mukosaentzündung führt, scheint der Effekt von Tocilizumab auf die Mukosaheilung also eher begrenzt zu sein (Mudter and Neurath 2007). Eine weltweite Untersuchung von Patienten mit rheumatoider Arthritis ergab 26 Fälle einer gastro-intestinalen Perforation, was einer Rate von 0,19 pro 100 Patientenjahren entspricht (Tanaka, Narazaki et al. 2012). Eine neuere Auswertung von 8580 Patientenjahren aus 8 Testreihen ergab für Tocilizumab hinsichtlich gastrointestinaler Perforation eine Rate von 0,28 pro 100 Patientenjahren (Schiff, Kremer et al. 2011). Auch wenn eine Vergleichsrate für Kortikosteroide einen Wert von 0,39 pro 100 Patientenjahren erbrachte, zeigt dies deutlich, dass die fehlende Wirkung von IL-6 über membrangebundene Signaltransduktion auf die Heilung der Mukosa, bei Anwendung einer globalen IL-6-Rezeptorblockade wie durch Tocilizumab, speziell bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nicht unterschätzt werden darf (Van Vollenhoven RF 2009; Campbell, Chen et al. 2011). Das Risiko von gastrointestinalen Perforationen erhöht sich weiter mit zunehmendem Alter und bei begleitender Einnahme von Kortikosteroiden (Navarro, Taroumian et al. 2014).

Daneben sind natürlich auch die nicht unerheblichen Nebenwirkungen von Tocilizumab durch die globale IL-6-Blockade zu berücksichtigen. Neben Malignitäten mit einer Rate von 1,1 pro 100 Patientenjahre wurden auch kardiovaskuläre Risiken wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall mit Raten von 0,25 bzw. 0,19 pro 100 Patientenjahren beobachtet. Die höchste Rate unerwünschter Nebenwirkungen zeigt sich jedoch mit 3,5 pro 100 Patientenjahren bei schweren Infektionen, wobei hier die Pneumonie mit einer Rate von 1,0 pro 100 Patientenjahren den größten Anteil hatte (Schiff, Kremer et al. 2011).

Zusätzlich hat eine globale Blockade von IL-6R und damit auch des klassischen IL-6-Signalings erhebliche metabolische Folgen. Eine Behandlung von Patienten der Castleman'schen-Krankheit mit Tocilizumab führte innerhalb von 16 Wochen zu einer Gewichtszunahme von durchschnittlich 4 kg und signifikanter Hypertriglyzämie (Nishimoto, Kanakura et al. 2005). Auch bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) zeigte sich ein vergleichbarer Effekt (Maini, Taylor et al. 2006; Smolen, Beaulieu et al. 2008)¹⁵.

Eine weitere Möglichkeit zur Blockierung des IL-6/STAT3-Signalwegs besteht in der spezifischen Blockade der Aktivierung der Januskinasen (JAK1 und 2). Der Tyrosinkinaseinhibitor Ruxolitinib blockiert diese Januskinasen und ist derzeit zugelassen für die primäre Myelofibrose. Diesem Ansatz folgend wurde der JAK-Inhibitor CEP-33779 auch im Rahmen eines DSS-AOM-Mausmodells für Colitis induzierten Darmkrebs mehreren Testreihen unterzogen. Die orale Gabe von CEP-33779 führte dabei zur Reduktion der kolorektalen Tumormasse und einer Reduktion der Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen, speziell auch IL-6. Ferner wurde eine Blockade von STAT3 und der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB nachgewiesen. In der Histologie zeigte

¹⁵ Ungeachtet dieser Datenlage existiert derzeit eine klinische Versuchsreihe in Japan für die Anwendung von Tocilizumab bei kolorektalem Krebs (UMIN00007493), deren Ergebnis bleibt abzuwarten (Tanaka and Kishimoto 2012).

sich eine Reduktion des Tumorausmaßes sowie ein reduziertes Tumorzellwachstum und eine verringerte Angiogenese (Seavey, Lu et al. 2012). Auch konnte für Ruxolitinib eine Induzierung von apoptotischem Zelltod durch Suppression von phosphorylierter JAK1 in humanen Darmkrebszellen gezeigt werden (An, Choi et al. 2014). Diese ersten Resultate können als ein vielversprechender Ansatz zur Therapie der entzündungsinduzierten Entwicklung von Darmkrebs gewertet werden.

1.3.3 Die selektive Blockade des Transsignalings von IL-6 durch sgp130Fc

Wie bereits oben ausgeführt, erfolgt der proinflammatorische Einfluss von IL-6 im Rahmen der chronisch entzündlichen Darmerkrankung und dem hiermit assoziierten Darmkrebs über das sogenannte Transsignaling, also die Bindung von IL-6 an seinen löslichen Rezeptor und dann wiederum die Bindung dieses Komplexes an die Zelloberfläche von Zellen mit exprimierten gp130. Das klassische Signaling über membranständige IL-6-Rezeptoren zeigt antiinflammatorische Effekte. Alle bisher beschriebenen Ansätze der IL-6-Blockade zeichnen sich jedoch durch eine undifferenzierte Blockade des Signalings von IL-6 aus.

Zur Reduktion von unerwünschten Nebenwirkungen und der Erhaltung der antiinflammatorischen Wirkung des klassischen Signalings liegt es nahe, sich bei der Blockade von IL-6 ausschließlich auf das pro-inflammatorische Transsignaling zu beschränken. Dies ist mit Hilfe des Fusionsproteins sgp130Fc möglich, das ausschließlich den löslichen IL-6/sIL-6R-Komplex neutralisiert (Jostock, Mullberg et al. 2001). Gerade in experimentellen Mausmodellen konnte sgp130Fc bereits seine Effektivität als Blockade des IL-6-Transsignalings im Rahmen der Reduktion von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Colitis assoziiertem Darmkrebs unter Beweis stellen (Becker, Fantini et al. 2004; Matsumoto, Hara et al. 2010; Chalaris, Garbers et al. 2011). Für an Morbus Crohn erkrankte Patienten konnte gezeigt werden, dass durch sgp130Fc der antiapoptotische Effekt von sIL-6R auf die mononukleären Zellen in der Lamina propria inhibiert (Jostock, Mullberg et al. 2001) und die durch den IL6-/sIL6-R-Komplex vermittelte Apoptoseresistenz von T-Zellen blockiert wird (Atreya, Mudter et al. 2000).¹⁶

Bezüglich der bei Tocilizumab beschriebenen Nebenwirkungen hinsichtlich der Homöostase der Glukosekonzentration zeigte sich bei transgenen sgp130Fc-Mäusen, die durch gentechnische Manipulation eine dauerhaft stark erhöhte Expression von sgp130Fc aufweisen, eine normale Glukosetoleranz.¹⁷

¹⁶ Neben sgp130Fc wurde 2010 auch ein selektiver Anti-Transsignaling-Antikörper, 25F10; entwickelt, der direkt gegen sIL-6R ausgerichtet ist (Lissilaa, Buatois et al. 2010). Dieser Antikörper erwies sich aber im Mausmodell hinsichtlich der selektiven Blockade des IL-6-Transsignalings als deutlich weniger potent im Vergleich zu sgp130Fc (Garbers, Thaiss et al. 2011).

¹⁷ Eine ausführliche Darstellung der metabolischen Folgen der verschiedenen Formen der IL-6-Blockade erfolgt in Kap 4.

1.4. Die Zielsetzung der Arbeit

Wie oben dargestellt, konnten *in vivo* Studien zeigen, dass IL-6 essentiell für die Differenzierung intestinaler Entzündungszellen ist (Ivanov, McKenzie et al. 2006). Da sgp130Fc ein effizienter Hemmstoff des IL-6-vermittelten Transsignalings ist und damit die Entwicklung von entzündungsfördernden oder -hemmenden Immunzellen beeinflussen kann (Dominitzki, Fantini et al. 2007), sollten die Auswirkungen von konstitutiv erhöhten sgp130Fc Spiegeln evaluiert werden.

In bisherigen Mausmodellen wurde kurz vor oder während des Entzündungszeitraums sgp130Fc in die Bauchhöhle der Mäuse appliziert. In diesen Modellen können jedoch nur die Auswirkungen einer kurzfristigen- aber nicht die Auswirkungen einer dauerhaften, also von Geburt an bestehenden, Blockade des Trans-Signalings studiert werden. Da bei Zuständen chronischer Darmentzündung oft eine jahrelange Entzündung besteht, kann hier eine langfristige Gabe entzündungshemmender Stoffe sinnvoll sein.

Daher stellt sich die Frage, ob die bereits vorliegenden Ergebnisse für Mäuse mit einer zeitlich begrenzten Erhöhung des sgp130Fc-Spiegels durch Injektion auch auf Mäuse mit einer durch gentechnische Manipulation erhöhten sgp130Fc-Konzentration im Blut übertragbar sind. Alternativ könnte eine permanente Erhöhung der Konzentrationen von sgp130Fc im Blut einen Einfluss auf das Immunsystem dieser Mäuse haben.

Um Aspekte dieser Fragestellungen zu untersuchen, wurden genetisch modifizierte Versuchstiere des Mausstamms C57BL/6N, sogenannte transgene sgp130Fc-Mäuse, mit nicht modifizierten C57BL/6N Mäusen im Rahmen eines Colitis- und eines Krebs-Colitis-Modells verglichen. Zusätzlich wurden in ausgewählten Versuchsreihen zum Vergleich nicht behandelte C57BL/6N Mäuse mit sgp30Fc peritoneal injiziert.

Zusätzliche Bestimmungen der Makrophagenentwicklung im Rahmen der Entzündung mit Hilfe der Durchflusszytometrie können dabei erste Hinweise auf unterschiedliche Immunreaktionen der verschiedenen Mauspopulationen im Rahmen des Colitismodells liefern.

2 Methoden

2.1 Verwendete Maustypen

Verwendet wurde der Wildtyp C57BL/6N, der unter denselben Bedingungen (Tierstall, Ernährung) gezüchtet wurde, wie die damit verglichenen transgenen Tiere. Ausnahme bildeten die von Dr. Spehlmann zusätzlich durchgeführten Untersuchungen insbesondere im Rahmen der Wiederholung des DSS-AOM-Versuchs, die im Wesentlichen auf direkt von Charles River bezogenen Tieren (C57BL/6N) beruhen.

Um die Wirkung einer dauerhaft erhöhten Serumkonzentration des Glykoproteins sgp130Fc zu untersuchen, wurde im Institut der Biochemie Kiel unter Verwendung des Plasmid pCR-Script-opt_sgp130Fc, ein transgener Mausstamm entwickelt, der in der Leber unphysiologisch hohe Mengen des löslichen gp130 mit angefügtem Fc-Teil, sgp130Fc, herstellt und ins Blut abgibt (Rabe et.a. 2008). Diese sogenannten transgenen sgp130Fc Mäuse wurden mindestens 6 Generationen auf den C57BL/6N-Hintergrund zurückgekreuzt. Es erfolgte für alle gezüchteten oder von anderen institutsinternen Zuchtlinien übernommenen Mäuse dieses Typs eine Bestimmung der Serumkonzentration für sgp130Fc mittels ELISA.

Abgesehen von den Vorversuchsreihen zur DSS-Colitis (DSS-1, DSS-2 wurden in den hier betrachteten und eigen durchgeführten Versuchsreihen DSS-3, DSS-4, DSS-5 sowie in den Krebsversuchsreihen DSS-AOM-1, DSS-AOM-2, DSS-AOM-3 nur Tiere mit Serum-Konzentrationswerten über 5-10 µg/ml verwendet. Dieses erhöhte Konzentration entspricht also mindestens einer 20-40 -fachen Erhöhung gegenüber der physiologischen Konzentration von sgp130 im Serum unbehandelter Mäuse.

Um den Einfluss eines unterschiedlichen Mikrobioms im Vergleich zwischen transgenen sgp130Fc – Mäusen und den Wildtypen vom Typ C57BL/6N möglichst gering zu halten, wurden die Wildtypen und transgenen Mäuse in den Versuchsreihen DSS-3, DSS-4 und DSS-5 sowie DSS-AOM-1 unter den selben Zuchtbedingungen (VHH) und mit gleicher Nahrung aufgezogen.

Der potentielle Einfluss eines durch den genetischen Eingriff veränderten Mikrobioms bei den transgenen Mäusen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden die beiden Vergleichsgruppen um eine dritte Gruppe von Mäusen des Typs C57BL/6N erweitert. Diesen Mäusen wurde bei Versuchsbeginn das Fusionsprotein sgp130Fc in einer Menge von 150 µg in Verbund mit PBS (1x) als 200 µl Gesamtlösung in die Bauchhöhle injiziert. Alle sonstigen Vergleichstiere erhielten zum selben Zeitpunkt eine entsprechende Injektion ausschließlich mit PBS (1x). Diese Injektionen wurden alle 7 Tage wiederholt. Eine Ausnahme bildet die Versuchsreihe DSS-5 wo auf eine entsprechende intraperitoneale Gabe von 10 µg sgp130Fc mit einer Wiederholung nach 4 Tagen umgestellt wurde.

2.2 Das DSS-Colitis-Modell

Dextran Sodium Sulfat (DSS) ist ein Natriumsalz, welches, beigemischt im Trinkwasser, zu einer Schädigung der epithelialen Schutzbarriere im Kolon führt. Hierdurch wird eine forcierte Infiltration von Bakterien in tiefere Gewebsschichten ermöglicht und damit eine Entzündung des Darms herbei geführt. Das in diesem Wirkstoff enthaltende Polysaccharid Dextran hat zusätzlich antithrombotische Wirkung.

Dieses DSS-Colitis-Modell, zuerst etabliert von Okayasu 1990 (Okayasu, Hatakeyama et al. 1990), ist seit über 20 Jahren eines der meist verwendeten Colitismodelle. Die Beliebtheit beruht auf der Tatsache, dass die hier zu beobachtenden Zytokinprofile sowie auch die histologischen Ergebnisse denen von chronischen Darmentzündungen, speziell der Colitis ulcerosa, ähnlich sind.

Zunächst wird das Trinkwasser für die Versuchstiere autoklaviert und gefiltert. Anschließend erfolgt die Beimischung von Dextran Sodium Sulfat zu einem bestimmten Prozentsatz für eine klar definierte Periode. Die Höhe der beigemischten DSS-Konzentration ist in der Literatur äußerst unterschiedlich und richtet sich auch nach dem verwendeten Maustyp. Der Grad der Darmentzündung, das Ausmaß an Ulzerationen und der blutigen Diarrhöen sowie des Gewichtsverlusts nehmen mit steigender DSS-Dosis zu (Egger, Buchler et al. 2000). In unserem Fall wurde analog jüngerer, vergleichbarer DSS-Studien (Qualls, Kaplan et al. 2006; Matsumoto, Hara et al. 2010) den Mäusen jeweils eine Konzentration von 3% DSS im Trinkwasser für 5 Tage gegeben. Anschließend wurde das Trinkwasser komplett ausgewechselt und wieder auf normales Trinkwasser umgestellt (Wirtz, Neufert et al. 2007). Das Körpergewicht, ein Haemocult-Test sowie die Stuhlkonsistenz der Versuchstiere wurden täglich erhoben. Die Stuhlkonsistenz wurde kategorisiert als 0 für normalen, 1 für weichen, aber geformten Stuhl, 2 für sehr weichen Stuhl und 3 für Diarrhöe. Die analoge Kategorisierung für Haemocult lautet 0 für negativen und 1 für positiven Haemocult-Test, sowie 2 für sichtbare Blutspuren im Stuhl und 3 für rektale Blutungen. Aus dem prozentualen Verlust des Körpergewichts sowie der jeweiligen Punktwerte für Haemocult und Stuhlkonsistenz kann nun ein klinischer Score, der Disease-Activity-Index (DAI), errechnet werden, der die Gesamtsituation der Entzündungen in seinen verschiedenen klinischen Dimensionen in einer Zahl abbildet (siehe Anhang). Das hier verwendete Modell geht zurück auf Siegmund (Siegmund, Rieder et al. 2001)

Das in dieser Form angewandte DSS-Colitis-Modell führt bei den betrachteten, mit sgp130Fc behandelten wie unbehandelten C57BL/6N bzw. transgenen sgp130Fc Mäusen zunächst nach ca. 3 bis 4 Tagen relativer Gewichtskonstanz zu einem langsam beginnenden Gewichtsverlust, der bis zum achten Tag zunimmt. Der achte Tag markiert in der Regel den Punkt der maximalen Darmentzündung. Hierauf folgt, gegeben eine entsprechende Versuchsdauer, eine sukzessive Erholung bis zum 21. Tag der Versuchsreihe, an dem die ursprüngliche Darmsituation teilweise wieder hergestellt ist. Zur histologischen Analyse des Entzündungsgeschehens wurde daher der achte Tag als Betrachtungszeitpunkt gewählt, da sich hier am deutlichsten Unterschiede im Entzündungsgeschehen zwischen den verschiedenen Maustypen widerspiegeln.

2.3 Das DSS-AOM-Krebs Modell

Beim DSS-AOM-Krebsmodell werden vor dem Hintergrund einer chronischen Entzündung durch wiederholte orale Gabe von Dextran Sodium Sulfat (DSS) Darmtumoren durch die mehrmalige Gabe des Prokarcinogens Azoxymethan (AOM) induziert. Azoxymethan wird dabei intraperitoneal injiziert und durch metabolische Aktivierung in O6-Methylin-Guanin umgewandelt.

Die Anwendungen dieses Modells zur Karzinogenese im Kolon unterscheiden sich nach Anzahl und Zeitpunkt der jeweiligen DSS und AOM-Gaben (de Robertis et.al. 2011). In dieser Arbeit wurde das DSS-AOM-Modell in einer Grundversion angewendet (Neufert et.al. 2007):

Nach einer initialen intraperitonealen Injektion von AOM in einer Dosierung von 10 mg/kg KG erfolgte 7 Tage später die erste orale Verabreichung von 2% DSS über das Trinkwasser für eine Dauer von ebenfalls 7 Tagen. Nach einer zweiten intraperitonealen Injektion von AOM in der abgeschwächten Dosierung von 5 mg/kg KG am Tag 21 der Versuchsreihe erfolgte eine Woche später wieder eine orale Gabe von 2 % DSS über das Trinkwasser für weitere 7 Tage. Den Abschluss der Behandlung bildete die finale orale Gabe von 2 % DSS über das Trinkwasser für 7 Tage in der achten Versuchswoche.

Die Evaluierung der induzierten, Colitis-assoziierten Karzinogenese erfolgte nach insgesamt rund 100 Tagen. Es wurde selektiv einem Teil der Versuchstiere 2 Stunden vor Versuchsende Bromdesoxyuridin (BrdU) in einer Dosierung von 10 µl/g (Verdünnung 0,1g/10ml) KG i.p. injiziert. Eine schematische Übersicht über den Zeitablauf der DSS-AOM-induzierten Karzinogenese zeigt die Abbildung 7. Die in der Versuchsreihe DSS-AOM-1 verwendete Charge des Wirkstoffs AOM von Sigma Aldrich führte bei Einsatz in einem anderen Krebsmodell im Unterschied zur hier beschriebenen Versuchsreihe zu einem nicht erklärbaren frühzeitigen Tod der Versuchstiere. Hieraus ergeben sich aber aus Sicht des Autors keine unmittelbaren Einschränkungen über die Gültigkeit der hier dargestellten Versuchsergebnisse.

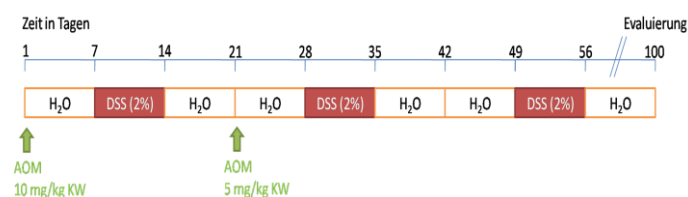


Abb.7: Schematische Darstellung des DSS-AOM-Krebsmodells

Die Auswertungen umfassten neben der histologischen Untersuchung (siehe 2.4), die makroskopische Erfassung des entnommenen Kolons (Fotographie) und weitere Organentnahmen und deren Gewichtsmessung (Leber, Milz, inguinale sowie mesenteriale Lymphknoten). 4 ausgewählte Versuchstiere (2 x C57BL/6N und 2 x sgp130Fc) wurden zusätzlich vor der Tötung einer Koloskopie unterzogen.

Die histologische Analyse der Karzinogenese erfolgte auf der Basis der in Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefertigten Kolonrollen („swiss-rolls“ siehe histologische Analyse). Hierbei wurden jeweils 3 aussagefähige Schnittebenen der Kolonrollen in Hämatoxylin-Eosin-Färbung aufbereitet. Auf Basis dieser Kolonrollen erfolgte am Mikroskop die Messung der Anzahl der Tumore und der Tumordurchmesser. Zusätzlich wurde das Ausmaß der Tumorausbreitung (als Summation der einzelnen Tumorflächen) bestimmt. Diese Messungen erfolgten mittels der Software „analysis“ von Olympus für jede Schnittebene. Anschließend wurde aus diesen Messungen jeweils der maximale Tumordurchmesser und die maximale Größe bzw. Fläche der Tumorausbreitung bestimmt. Für die Festlegung der Anzahl der Tumore wurde die Schnittebene ausgewählt, die auch für die Berechnung der maximalen Tumorgröße verwendet wurde. So ist weitgehend sichergestellt, dass Tumore, bedingt durch den jeweiligen Anschnitt, nicht mehrfach gezählt werden.

2.4 Histologische Analyse

2.4.1 Anfertigung und Färbung von Kolonrollen

Zunächst wurde das Kolon im Rahmen der Präparation komplett entnommen, von bestehenden Geweberesten weitestgehend befreit, längsseits am Ansatz des Mesenteriums aufgeschnitten und in einer Phosphat gepufferten physiologischen Salzlösung (PBS) gereinigt. Im Anschluss wurde der Darm beginnend mit der proximalen Verbindungsstelle zum Caecum und mit der Innenseite nach außen orientiert um den Stil eines Wattestäbchens aufgewickelt, sodass eine sogenannte Kolonrolle entstand. Die aufgewickelte Kolonrolle wurde zunächst mittels Paraformaldehyd (PFA) und in den folgenden Schritten nach entsprechender Aufbereitung in Paraffin fixiert. Zum Abschluss wurden die so erstellten Paraffinblöcke der Kolonrollen auf unterschiedlichen Höhen geschnitten und diese Schnitte in zwei Arten gefärbt:

- in einer Basisfärbung mittels Hämatoxylin-Eosin zur Beurteilung des Entzündungsgrades in verschiedenen Darmabschnitten, Messung von Ulzerationen bzw. der quantitativen Analyse einer Karzinogenese sowie
- einer Färbung für Makrophagen (F4/80) um die Infiltration von Makrophagen in ausgewählten Entzündungsregionen zu verschiedenen Entzündungszeitpunkten zu beurteilen.

Die hier beschriebene Vorgehensweise erlaubt die Beurteilung des gesamten Darms und ist daher den üblichen Einzelbetrachtungen ausgewählter Entzündungsregionen überlegen.

2.4.2. Qualitative und quantitative Analyse der Histologie

Die qualitative Beurteilung des Entzündungsgeschehens im Rahmen der DSS-Colitis erfolgte mit Hilfe des Histologie-Scores von Rachmilewitz (Rachmilewitz, Karmeli et al. 2002). Dieser Score differenziert nach den einzelnen Schichten der Darmwand:

- Für das Epithel gilt der Wert
 - 0 für fehlenden pathologischen Befund,
 - 1 bei Hyperproliferation, irregulären Krypten und Verlust von Becherzellen,
 - 2 – 4 bei mildem, starkem bzw. kompletten Verlust von Krypten, sowie
 - 5 bei Ulzerationen unter einer Länge von 10 Krypten und
 - 6 darüber.
- Separat wird die Infiltration der Mukosa mit Entzündungszellen bewertet (0 = normal, 1 = mild, 2 = mäßig und 3 = stark),
- gleiches gilt für die Submukosa (0 = normal, 1 = mild bis mäßig und 2 = stark)
- und die Serosa (0 = normal und 1 = moderat bis stark).

Die Werte werden dann zu einem Gesamtergebnis für den Epithelschaden und die Infiltration mit Entzündungszellen zusammengezählt, so dass ein Wert von 0 bis 12 resultiert. Ein illustratives Beispiel ist in Abb. 8 dargestellt. Histologische Referenzbeispiele für die verschiedenen Stadien des Entzündungsgeschehens sind im Anhang für jedes Stadium abgebildet. Die Beurteilung erfolgte wie immer unabhängig erst durch den Autor und anschließend durch Dr. Spehlmann.

Zur quantitativen Beurteilung der DSS-Colitis wurden für jedes Versuchstier die Ulzerationen in den Kolonrollen in drei Ebenen mittels der „analysis“-Software von Olympus ausgemessen. Die gemessenen Ulzerationen wurden innerhalb der Ebenen addiert. Die Messung erfolgte dabei wiederum unabhängig durch Dr. Badke und zur Kontrolle durch Dr. Spehlmann.

Färbungen von Makrophagen (F4/80) geben einen qualitativen Hinweis auf die Infiltration. Diese Histologien sollten jedoch nicht durch eine Quantifizierung überinterpretiert werden, so dass eine quantitative Analyse hier unterblieb.

Im Rahmen der histologischen Analyse der Karzinogenese wurden analog Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von Schnitten der Kolonrollen auf drei Ebenen angefertigt. Für jeden dieser Schnitte wurden mit Hilfe der „analysis“-Software von Olympus die Tumoren ausgezählt, ihr maximaler Durchmesser (tumor load) bestimmt und die Fläche der Tumoren ausgemessen.

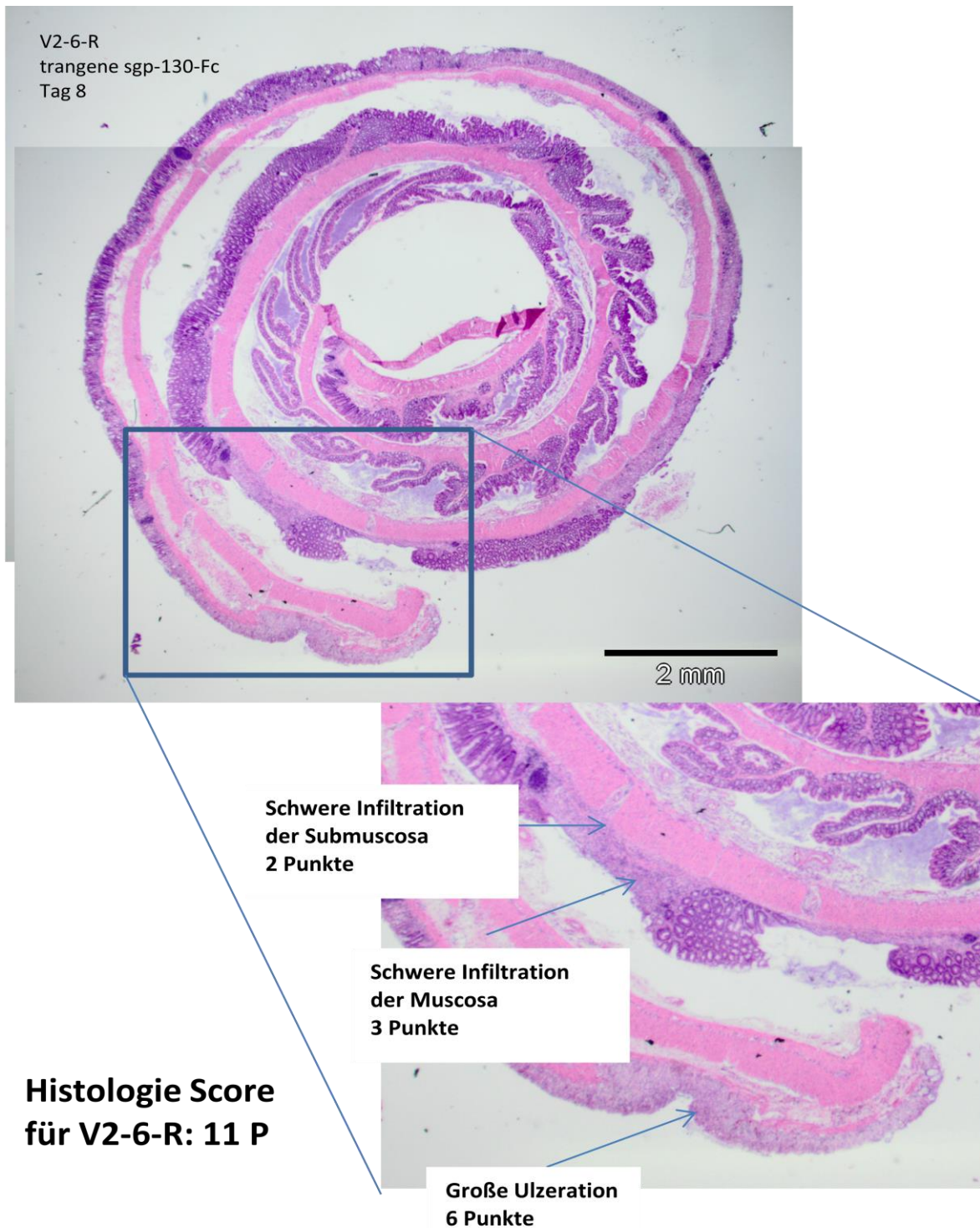


Abb. 8: Beispielhafte Darstellung der histologischen Bewertung des Entzündungsgeschehens für eine transgene sgp130-Fc –Maus (V2-6-R) im Rahmen der DSS-Colitis an Tag 8 nach Start der DSS-Gabe auf der Basis der Kolon-Rolle und des Scores von Rachmilewitz (weitere Beispiele siehe Anhang)

2.5 Analyse von Immunzellen der Lamina propria mittels Durchflusszytometrie

Um die Immunzellen aus der Lamina propria zu analysieren, wurde zuerst das Kolon präpariert, danach die Immunzellen aus dem Kolon isoliert und markiert und abschließend diese mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantitativ analysiert (Weigmann et. al 2007).

Zuerst wurde das entnommene Kolon längs am Ansatz des Mesenteriums aufgeschnitten, mit PBS (1x) gespült und in 0,5 cm lange Stücke geschnitten. Um nun die Immunzellen aus dem Darm zu isolieren, wurde in einem ersten Schritt das Epithel aus den Kolonstücken entfernt, um dann in einem zweiten Schritt aus diesen Kolonstücken die Immunzellen durch ein Lamina-propria-Medium zu isolieren:

- Unmittelbar nach erfolgter Präparation wurden die Kolonstücke in 12,5 ml des vorbereiteten EDTA-Mediums (pro Maus: HBSS 95ml, FCS 5ml, EDTA 0,5ml (0,5M)) bei 37 Grad Celsius und 0,4 g für 6 min inkubiert. Anschließend wurden die Kolonstücke mit dem Medium mittels eines Vortexers für eine Minute (Stärke 2-5) verwirbelt, der Überstand mit den dort enthaltenden Epithelzellen verworfen und erneut 12,5 ml EDTA-Medium hinzugegeben. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt. Die Konzentration der Epithelzellen im Überstand, erkennbar durch eine entsprechende Eintrübung, nahm dabei stetig ab. Die nun von den Epithelzellen weitgehend befreiten Kolonstücke schwebten im Überstand und wurden abschließend in ein neues Reagenzgefäß überführt, das 12,5 ml eines Mediums für die Extraktion der Immunzellen aus der Lamina propria (LPM) (pro Maus: DNEM+FCS+P/S 25ml, DNase 1,2ml, Kollagenase (D) 15,5 mg) enthielt.
- Die Inkubation der Darmstücke erfolgte nun im LPM für 20 Minuten bei 37 Grad und 0,4 g. Anschließend wurde der Inhalt des Reagenzgefäßes mit Hilfe eines Vortexers für eine Minute bei mittlerer Stärke verwirbelt, so dass sich die Immunzellen nun durch die im LPM enthaltenen Enzyme von der Kolonoberfläche herauslösten und im Überstand befanden. Dieser Überstand wurde entnommen und gefiltert in ein neues 50ml Reagenzgefäß gegeben. Anschließend wurde das Reagenzgefäß mit den Kolonstücken wiederum mit 12,5 ml LPM aufgefüllt und der obige Vorgang wiederholt. Es resultierte ein 50ml Reagenzgefäß, gefüllt mit ca. 20 ml gefiltertem LPM, in dem sich die Immunzellen aus der Lamina propria der untersuchten Maus befanden. Dieses Reagenzgefäß wurde nun mit neutralem Medium, bestehend aus DNEM+FCS+P/S, auf 50ml aufgefüllt und diese Zellsuspension bei 25 g und einer Temperatur von 4 Grad Celsius für 10 Minuten zentrifugiert. Danach befanden sich alle Immunzellen am Boden des Reagenzgefäßes. Der Überstand im Reagenzgefäß wurde verworfen und der Bodensatz mit den Immunzellen mit 2 ml Reagent Diluent resuspendiert. Diese Zellsuspension mit hoher Immunzellkonzentration wurde je nach Analyseprofil mit mindestens 100 µl pro Vertiefung auf eine Spitzbodenplatte zur weiteren Verarbeitung (Markierung mit Antikörpern) verteilt.

Um die verschiedenen Immunzellen nun mittels Durchflusszytometrie zu untersuchen, wurden sie mit Antikörpern markiert und gefärbt. Dafür wurden 0,25 bis 0,5 µg des jeweiligen Antikörpers in die jeweilige Vertiefung der Spitzbodenplatte eingebracht und mit der Immunzellsuspension vermischt. Grundsätzlich wurden dabei alle Immunzellen in den verwendeten Vertiefungen der Spitzbodenplatte mit CD45, dem

allgemeinen Oberflächenmarker für Leukozyten markiert, um später eine gezielte Vorselektion und damit Konzentration auf Leukozyten bei den zu betrachtenden Zellen zu ermöglichen. Anschließend wurden in die jeweiligen Vertiefungen der Spitzbodenplatte je nach Fragestellung weitere Antikörper hinzugefügt: So wurden Zellen beispielsweise mit CD45 und F4/80 (als Oberflächenmarker für Makrophagen) markiert, um diese später in der Durchflusszytometrie als Makrophagen, einer Subpopulation der Leukozyten, getrennt betrachten zu können.¹⁸

Zur weiteren Aufbereitung der Immunzellen wurde die Spitzbodenplatte für 10 Minuten in Dunkelheit gekühlt, anschließend 100 µl Reagent Diluent pro Vertiefung hinzugegeben und die Platte mit 1200 rpm bei 4 Grad Celsius für 7 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand aus den Vertiefungen der Spitzbodenplatte verworfen, erneut 200 µl Reagent Diluent pro Vertiefung hinzugegeben und erneut mit oben Werten zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Abschließend wurden die mit 200 µl Reagent Diluent pro Vertiefung resuspendierten, markierten Immunzellen in ein mit 600 µl Reagent Diluent gefülltes Reagenzgefäß zur weiteren Analyse mittels Durchflusszytometrie gegeben.

In der Durchflusszytometrie wird die zu untersuchende Probe in einer Kapillare so fokussiert, dass jede Zelle einzeln nacheinander durch einen mit einem Laser bestrahlten Messbereich läuft. In diesem Messbereich trifft ein Laserstrahl auf die Einzelzelle und das dabei entstehende Streulicht oder Fluoreszenzsignal wird von einem Detektor analysiert.

Als Vorgehensweise zur möglichst genauen Identifikation einzelner Immunzellarten wurde nach Rücksprache mit Dr. Wahl von BD-Pharmingen folgende Vorgehensweise abgestimmt:

- Zunächst wurden die nicht relevanten Zellfragmente ausgeschlossen und aus der resultierenden Zellpopulation die Leukozyten mittels ihres Oberflächenmarkers CD45 in einem Histogramm dargestellt und so herausgefiltert.
- Anschließend wurde zur Identifikation einer Subpopulation dieser Leukozyten, beispielsweise die T-Zellen mit ihrem zusätzlichen Oberflächenmarker CD3, mittels eines Streudiagramms in vier Gruppen unterteilt, um sich auf den Quadranten mit den Zellen mit gleichzeitig hoher Ausprägung der Oberflächenmarker CD45 und CD3 zu konzentrieren.
- Innerhalb der Zellen in diesem Quadranten erfolgte abschließend mittels eines weiteren Histogramms des immunzellspezifischen Oberflächenmarkers, also im Beispiel der T-Zellen mit CD3, die Fokussierung auf die homogene CD3 positive Zellpopulation in diesem Quadranten. Im Fall einer weiteren Selektion, wurde das Verfahren entsprechend wiederholt.
- Abschließend wurde dann der relative Anteil von spezifischen Immunzellen an der Gesamtpopulation der Leukozyten in der Lamina propria des Kolons zu den verschiedenen Entzündungszeitpunkten (Tag 0, 4 und 8) nach DSS-Gabe für die 3 verschiedenen Maustypen verglichen.
- Dieser Ablauf wurde zur Absicherung der Ergebnisse für die verschiedenen Untersuchungszeitpunkte in unterschiedlicher Häufigkeit wiederholt.

¹⁸ Für die im Rahmen der Durchflusszytometrie notwendige spätere Kompensationskontrolle wurden sogenannte Beads verwendet.

Beispielhaft ist in Abb. 9 die Selektion der CD45+CD3+ - Zellen für die Wildtypen (C57BL/6N) zum Zeitpunkt Tag 0 in der Lamina propria des Kolons illustriert.

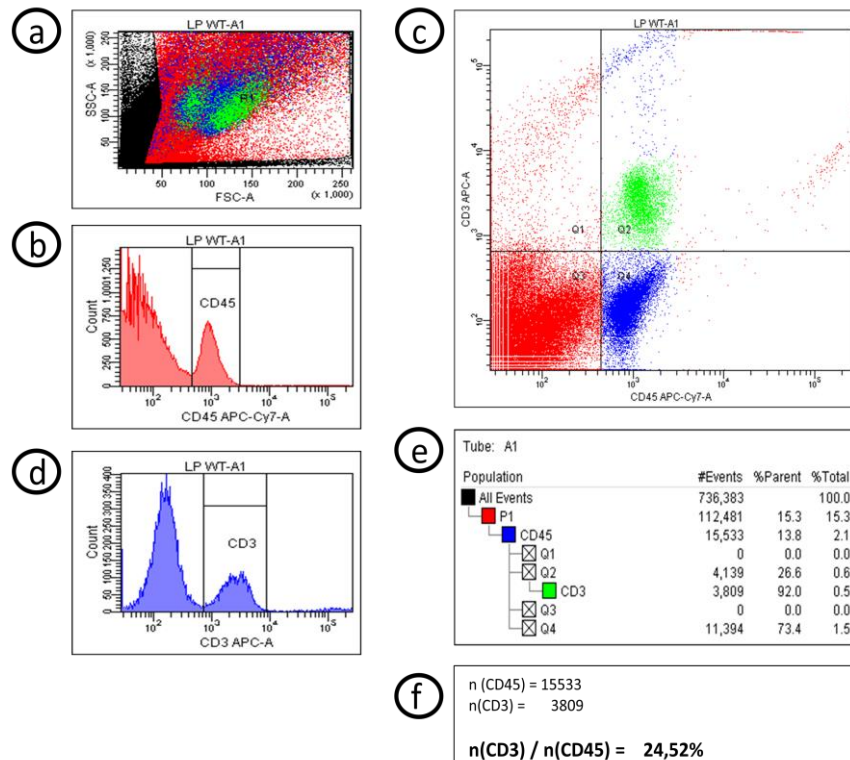


Abb. 9: Berechnung der relativen Immunzellanteile der Leukozyten:

- Eingrenzung auf die zu untersuchenden Zellen
- weitere Konzentration auf die CD45+ Zellen (Leukozyten) mittels Histogramm
- Abbildung dieser Leukozyten in einem Streudiagramm zusammen mit der zu untersuchenden Immunzellpopulation (hier CD3) und Unterteilung dieses Diagramms in 4 Quadranten. Der Quadrant Q2 enthält nun alle CD3+CD45+ Zellen.
- Die Q2-Population wird nochmals bzgl. CD3 in einer Histogrammdarstellung abgebildet, um so auch nur die relevante Zellpopulation zu selektieren.
- Die Ergebnisse werden zusammengefaßt und
- als relative Größen der Abbildung hinzugefügt.

Dieses Verfahren wurde mit den verschiedenen Maustypen zu unterschiedlichen Entzündungszeitpunkten durchgeführt und so zum Beispiel untersucht, ob und wie sich der Anteil der Makrophagen an den Leukozyten in der Lamina propria im Rahmen einer Entzündung zu verschiedenen Zeitpunkten für unterschiedliche Maustypen verändert. Gleiches gilt entsprechend für alle anderen Immunzellarten, die extrazellulär durch entsprechende Oberflächenmarker gekennzeichnet wurden.

Die hier durchgeführten Analysen wurden zur Absicherung der Ergebnisse mehrfach wiederholt. Insgesamt wurden 44 Versuchstiere für Messungen mit Hilfe der Durchflusszytometrie eingesetzt. Jedoch konnte nach Selektion über CD45 nicht immer eine ausreichende verbleibende Zahl an zu betrachtenden Immunzellen gewonnen werden. Daher wird sich in Abschnitt 3.1.4. auf die Darstellung von aussagefähigen Einzelmessungen beschränkt, die folglich auch nur als Hinweis auf potentielle Unterschiede in den Immunreaktionen der verschiedenen Maustypen unter DSS-Colitis dienen können.

2.6 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mit dem Programm Sigmaplot 12. Bei Überprüfung der Signifikanz von Ergebnisunterschieden erfolgte zunächst die Überprüfung der Normalverteilungsannahme für die zugrundeliegenden Vergleichsdaten mit Hilfe des Tests von Shapiro-Wilk. Bei Bestätigung der Normalverteilungsannahme erfolgte die Beurteilung der Signifikanz der betrachteten Ergebnisunterschiede mit Hilfe des T-Tests, ansonsten wurde auf den Mann-Whitney-Ranksummen-Test zurückgegriffen.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von sgp130Fc bei transgenen Mäusen und Injektion im Vergleich zu C57BL/6N Wildtypen im Rahmen der DSS-Colitis

3.1.1 Übersicht über die Versuchsreihen

Aufbauend auf den beiden Vorversuchen wurden 3 Versuchsreihen zur Analyse von sgp130Fc in der DSS-Colitis durchgeführt. Nachdem in den Vorversuchen der Schwerpunkt auf den kompletten Entzündungsverlauf inklusive der Regeneration gelegt wurde, steht in den folgenden 3 Versuchsreihen die eigentliche Entzündungsphase im Vordergrund. Wie bereits erwähnt, werden hierfür Tag 4 als früher Entzündungszeitpunkt und Tag 8 als Punkt des maximalen Entzündungsgeschehens als Beobachtungszeitpunkt ausgewählt. Die 3 Versuchsreihen wurden ergänzt durch parallele Untersuchungen der Entzündungsverläufe von Einzeltieren bzw. Tierpaaren mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Insgesamt ergibt sich somit folgender Versuchsaufbau (Tabelle 1):

Studie	Ziel und Struktur	verwendete Maustypen	Anzahl	davon vorzeitig verstorben
DSS-1	Vergleich von C57BL/6N von Charles River zu transgenen sgp130Fc-Mäusen aus eigener Zucht, bezüglich langfristigem Entzündungsverhalten nach DSS-Gabe (inklusive Regeneration) Studienlänge: 21 Tage DSS Periode (Tage): 5 mit 3%	C57BL/6N -Charles River	10	-
		tr. sgp130Fc – VHH	11	3
DSS-2	Vergleich von C57BL/6N von Charles River zu transgenen sgp130Fc-Mäusen aus eigener Zucht, bezüglich akutem und mittelfristigem Entzündungsverhalten nach DSS (inkl. beginnender Regeneration) Studienlänge: 7 bzw. 14 Tage DSS Periode (Tage): 5 mit 3%	C57BL/6N -Charles River	15	5
		tr. sgp130Fc – VHH	9	4
DSS-3	Vergleich von unbehandelten und mit sgp130Fc injizierten C57BL/6N zu transgenen sgp130Fc-Mäusen, jeweils aus eigener Zucht, bezüglich akutem Entzündungsverhalten nach DSS Studienlänge: 8 Tage DSS Periode (Tage): 5 mit 3%	C57BL/6N –VHH	11	-
		C57BL/6N -VHH (inj)	9	1
		tr. sgp130Fc – VHH	10	-
DSS-4	Vergleich von unbehandelten und mit sgp130Fc injizierten C57BL/6N zu transgenen sgp130Fc-Mäusen, jeweils aus eigener Zucht, bezüglich akutem Entzündungsverhalten nach DSS Studienlänge: 8 Tage DSS Periode (Tage): 5 mit 3%	C57BL/6N –VHH	5	-
		C57BL/6N –VHH (inj)	5	-
		tr. sgp130Fc – VHH	7	-
DSS-5	Vergleich von unbehandelten und mit sgp130Fc injizierten C57BL/6N zu transgenen sgp130Fc-Mäusen, jeweils aus eigener Zucht, bezüglich akutem Entzündungsverhalten nach DSS Studienlänge: 8 Tage DSS Periode (Tage): 5 mit 3%	C57BL/6N –VHH	12	-
		C57BL/6N –VHH (inj)	3	-
		tr. sgp130Fc - VHH	17	-

Tabelle 1: Übersicht über die Versuchsreihen der DSS-Colitisversuche DSS-1 bis DSS-5

3.1.2 Klinische Unterschiede im Entzündungsverlauf

3.1.2.1 Langzeitbetrachtung inklusive Regeneration

Der detaillierten Analyse der unterschiedlichen Wirkungsweise von sgp130Fc im Entzündungsprozess der DSS-Colitis gingen zwei Versuchsreihen DSS-1 und DSS-2 voraus, die sich auf den Vergleich von unbehandelten Wildtypen und transgenen sgp130Fc-Mäusen über einen verlängerten Entzündungsverlauf inklusive einer Phase der Regenerierung konzentrierten. Es zeigt sich in beiden Versuchen ein stärkerer relativer Gewichtsverlust für die transgenen sgp130Fc-Mäuse mit maximaler Ausprägung für beide Maustypen an Tag 7 bzw. 8 nach Versuchsstart (Abb. 10). Darüber hinaus zeigten die transgenen sgp130Fc-Mäuse einen langsameren Gewichtsanstieg nach der akuten Entzündungsphase, der sich in signifikanten, tagesspezifischen Gewichtsunterschieden zwischen den beiden Maustypen ab dem 14. Tag in der Versuchsreihe DSS-1 widerspiegelte.

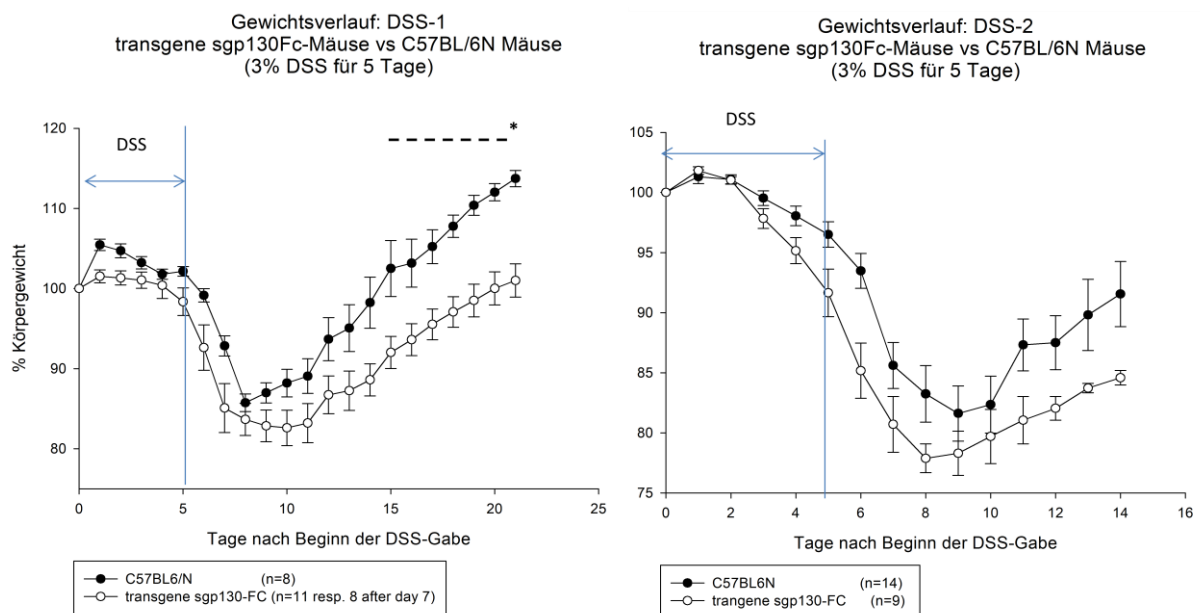
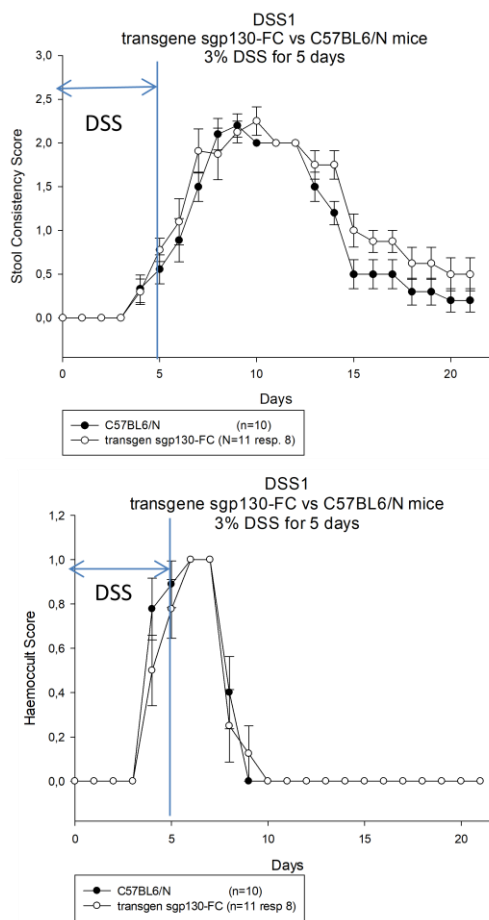


Abb. 10: Versuchsreihe DSS-1 und DSS-2: Gewichtsverlauf nach 3% DSS-Gabe im Trinkwasser für 5 Tage
(--* = Signifikanz der Unterschiede der relativen Tagesgewichte mit $p < 0,05$)

Die Stuhlkonsistenz und der Haemocult-Index wiesen für beide Maustypen keinen signifikant unterschiedlichen Verlauf auf. Durch den Disease-Activity-Index (DAI) nach Sigmund (Sigmund, Rieder et al. 2001) kann die klinische Gesamtsituation der Entzündung beschrieben werden (siehe Anhang). Auch dieser DAI dokumentiert als umfassender Marker für die Entzündungsintensität die langsamere Rekonvaleszenz der transgenen sgp130Fc-Mäuse in der DSS-Colitis. So ergeben sich auch an den Tagen 10, 11 und 13 – 17 nach DSS-Gabe noch signifikante relative Unterschiede zwischen beiden Maustypen für den DAI (Abb. 11). Die hier beobachtete Signifikanz der Unterschiede in der Rekonvaleszenz zeigte sich, obwohl in der Versuchsreihe DSS-1 4 der 11 transgenen sgp130Fc-Mäuse nur ein sgp130Fc-Serum-Level zwischen 0,4 und 1,6 $\mu\text{g/ml}$ aufwiesen und sich damit hinsichtlich der sgp130Fc-Konzentration nicht so deutlich von den Wildtypen unterschieden, wie dies bei den späteren Versuchsreihen der Fall war.



Disease activity index (dai) (nach Siegmund B. et al 2001)

Gewichtsverlust:
0 = 0- 5 % ; 1 = 5- 10%; 2 = 10- 15%; 3 = 15 - 20%; 4 > 20%
Haemocult:
0 = negativ; 2 = positiv
Stuhlkonsistenz:
0 = normal; 1 = soft, but shaped; 2 = very soft; 4 = Diarrhoe
Average for WT (n=10) and sgp (n=11 resp. 8)

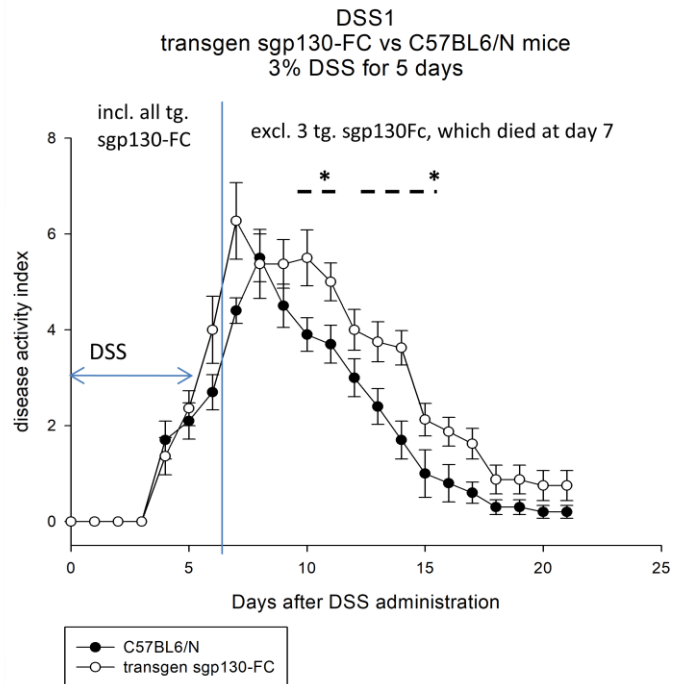


Abb. 11: Versuchsreihe DSS-1: Stuhlkonsistenz, Haemocult und Disease Activity Index nach 3% DSS-Gabe im Trinkwasser für 5 Tage (--* = Signifikanz für tagesspezifische DAI-Unterschiede ($p < 0,05$))

Die hier dargestellten Ergebnisse sind jedoch einer Einschränkung unterworfen. Die einbezogenen Wildtypen (C57BL/6N) wurden teilweise von Charles-River bezogen und weisen folglich nicht die identischen Zuchtbedingung wie die transgenen Mäuse auf, die aus eigener Zucht (Viktor-Hensen-Haus) stammten. Ein potentieller Einfluss hieraus auf Unterschiede im Mikrobiom der Tiere kann folglich nicht ausgeschlossen werden. Ein unterschiedliches Mikrobiom kann jedoch Einfluss auf die hier diskutierten Entzündungsverläufe in einer DSS-Colitis haben (Elson, Cong et al. 2005)¹⁹.

¹⁹ Für eine ausführliche Darstellung des Einflusses des Mikrobioms des Darms auf die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit sei auf die Diskussion (Kap. 4.1) verwiesen.

3.1.2.2 Betrachtung der Frühphase der DSS-Colitis

In der ersten Versuchsreihe (DSS-3) zeigte sich zunächst bis Tag 4 nach Start der DSS-Gabe ins Trinkwasser ein relativ konstanter Gewichtsverlauf bei allen drei Maustypen. Beginnend mit Tag 5 war jedoch ein deutlicher kontinuierlicher Gewichtsverlust bei den unbehandelten Wildtypen und transgenen sgp130Fc-Mäusen zu beobachten. Die mit sgp130Fc zweimal im Abstand von 7 Tagen peritoneal injizierten Wildtypen zeigten den geringsten Gewichtsverlust. Während sich in den beiden Versuchsreihen DSS-3 und DSS-4 die Unterschiede in der Wirkungsweise von sgp130Fc (injiziert contra transgen) hinsichtlich des Gewichtsverlaufs als signifikant erwiesen, konnte nur in DSS 4 die Verringerung des Gewichtsverlusts durch Injektion von sgp130Fc gegenüber dem unbehandelten Wildtyp als signifikant bestätigt werden. Da die beiden Versuchsreihen DSS-3 und DSS-4 den exakt gleichen Versuchsaufbau aufweisen, konnten daher die Ergebnisse beider Versuche auch in einem Resultat zusammengefaßt werden.

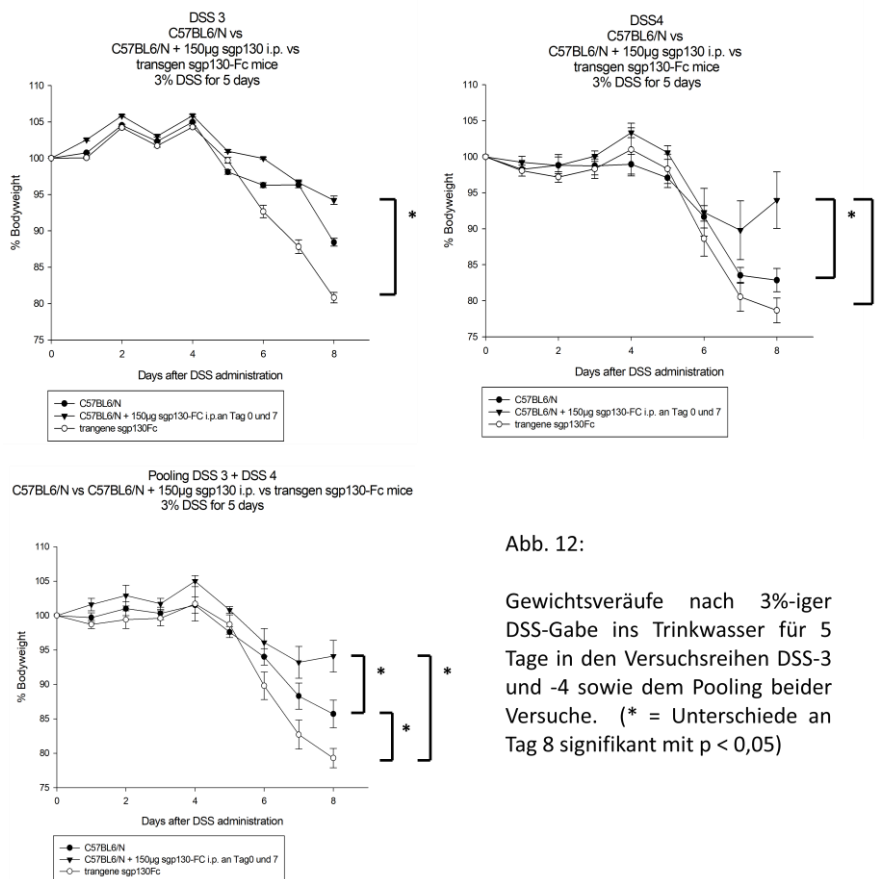


Abb. 12:

Gewichtsverläufe nach 3%-iger DSS-Gabe ins Trinkwasser für 5 Tage in den Versuchsreihen DSS-3 und -4 sowie dem Pooling beider Versuche. (* = Unterschiede an Tag 8 signifikant mit $p < 0,05$)

Bei Zusammenführung der Versuchsreihen DSS-3 und DSS-4 zeigte sich ein signifikanter Gewichtsunterschied an Tag 8 sowohl zwischen mit sgp130Fc injizierten und unbehandelten Wildtypen, als auch zwischen unbehandeltem Wildtyp und transgenen sgp130Fc-Mäusen sowie injizierten sgp130Fc Wildtypen und transgenen sgp130Fc-Mäusen (Abb. 12). Eine Injektion von sgp130Fc kann die Gewichtsreduktion nach DSS-Gabe also signifikant reduzieren, ein dauerhaft erhöhter sgp130Fc-Spiegel im Serum durch transgene Veränderung führt jedoch zum gegenteiligen Effekt. Diese Ergebnisunterschiede deuten darauf hin, dass sich

durch dauerhaft fehlendes Transsignaling bei den transgenen Versuchstieren eventuell ein ganz anderes Immunsystem gebildet hat, welches zu den beobachteten Unterschieden in der Gewichtsentwicklung führt.

Die unterschiedliche Wirkungsweise von sgp130Fc im Rahmen der DSS-Colitis, speziell die deutlich höhere Gewichtsabnahme der transgenen sgp130Fc-Mäuse gegenüber den unbehandelten Wildtypen, ließ sich zumindest vor dem Hintergrund der bisherigen Ergebnisse in der Literatur nicht erwarten. Daher wurde eine weitere Versuchsreihe mit einer erheblich höheren Anzahl von Versuchstieren, unbehandelten Wildtypen und transgenen sgp130Fc-Mäusen, angesetzt. Die Serumkonzentration von sgp130Fc war in dieser Versuchsreihe (DSS-5) bei den transgenen Versuchstieren im Durchschnitt höher als in den vorherigen Versuchsreihen (DSS-3, DSS-4). Zusätzlich wurde eine kleinere Anzahl an Wildtypen mit einem modifizierten Injektionsschema (kürzere Abstände (4 statt 7 Tage) und niedrigerer Dosis (10 µg statt 150 µg)) für sgp130Fc in die Versuchsreihe (DSS-5) aufgenommen (Abb. 13).

Es bestätigt sich der signifikant höhere Gewichtsverlust der transgenen sgp130Fc-Mäuse gegenüber den unbehandelten Wildtypen im Rahmen der DSS-Colitis und damit auch der Verdacht hinsichtlich einer möglichen unterschiedlichen Immunreaktion aufgrund einer dauerhaften Blockade des Transsignalings bei den transgenen Versuchstieren. Gleichzeitig zeigt sich, dass ein verkürzter Injektionsabstand trotz erheblich niedrigerer Dosis bei der Injektion von sgp130Fc für die hier behandelten Mäuse zu einer weitgehenden Vermeidung eines Gewichtsverlustes führt. Dies gibt einen Hinweis auf die Bedeutung des spezifischen Injektionsschemas für die klinische Wirkungsweise von injiziertem sgp130Fc und unterstreicht das Potential von injiziertem sgp130Fc als Wirkstoff zur Vermeidung einer akuten DSS-Colitis.

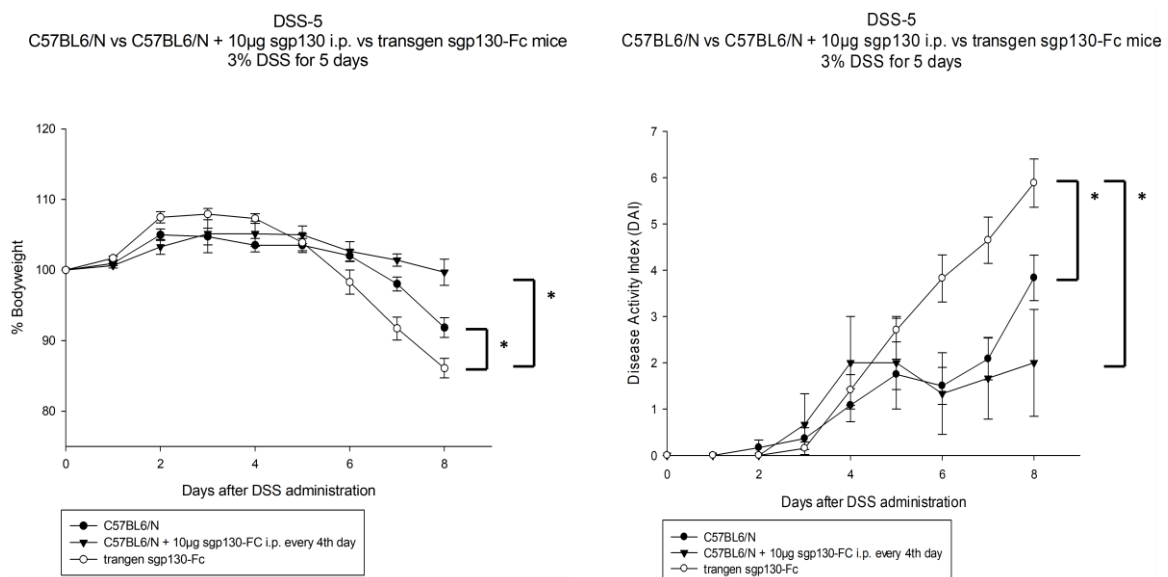


Abb. 13: Gewichts- und DAI-verläufe nach 3%-iger DSS-Gabe ins Trinkwasser für 5 Tage in der Versuchsreihe DSS-5 (* = Unterschiede an Tag 8 signifikant mit $P < 0,05$)

Der Krankheitsaktivitätsindex (DAI), also unter Berücksichtigung von Haemocult und Stuhlkonsistenz, zeigte ein vergleichbares Bild: Mit sgp130Fc injizierte Tiere zeigen die niedrigste Ausprägung in der

Entzündungsintensität. Im Gegensatz dazu war die Symptomatik der DSS-Colitis bei den transgenen sgp130Fc-Mäusen deutlich ausgeprägter. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen „Applikationsformen“ von sgp130Fc sowie zwischen den transgenen sgp130Fc Mäusen und den unbehandelten Wildtypen sind hinsichtlich ihrer klinischen Symptomatik (DAI) signifikant.

Einen ersten Hinweis, in wieweit lymphatische Organe unterschiedliche Rollen in der Immunreaktion der verschiedenen Maustypen spielen, liefern die relativen Organgewichte am Tag 4 und 8 nach DSS-Gabe. Hierzu wurden im Rahmen der Versuchsreihe DSS-3 die Summe aus rechten und linken inguinalen Lymphknoten, den mesenterialen Lymphknoten und der Milz mit ihrem jeweiligen Gewicht relativ zum Körpergewicht gemessen (Abb. 14). Dabei zeigte sich an Tag 4 bei allen Maustypen kein signifikanter Unterschied in den relativen Gewichten von Lymphknoten und Milz.

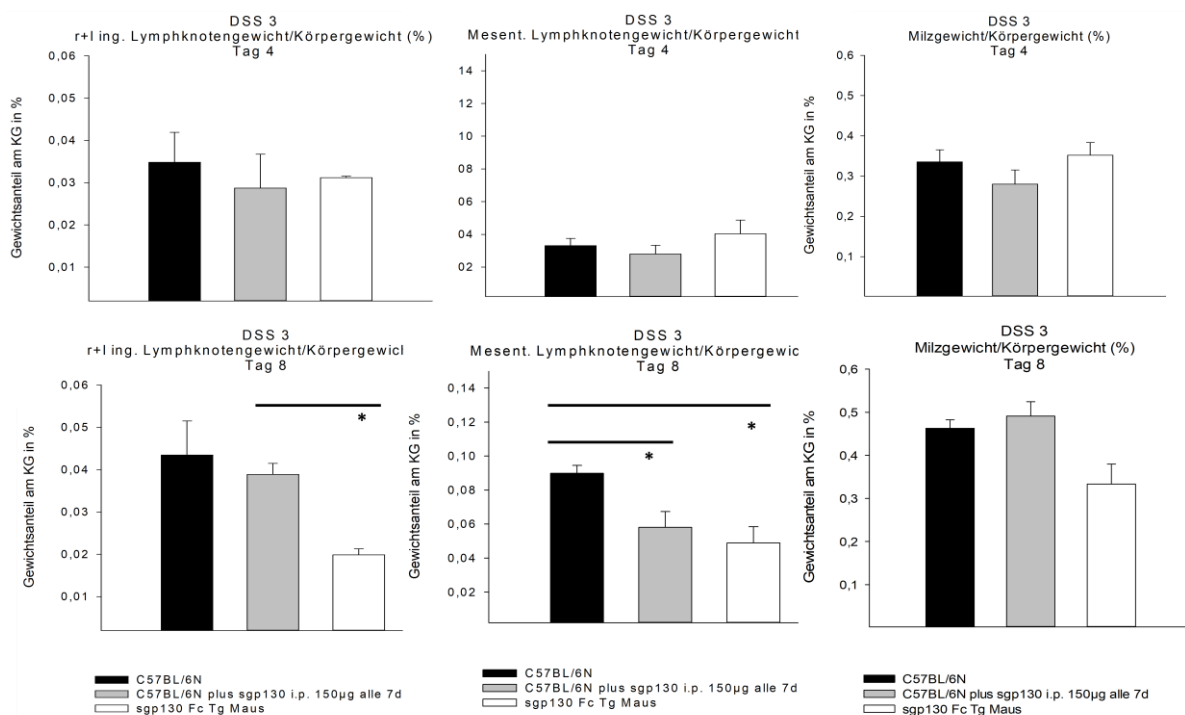


Abb. 14: Vergleich der relativen Gewichte von inguinalen, mesenterialen Lymphknoten und der Milz bezogen auf das Körpergewicht an Tag 4 und 8 nach DSS-Gabe (- * = signifikanter Unterschied mit p < 0,05)

Am Tag 8 nahm das relative Gewicht der mesenterialen Lymphknoten bei den unbehandelten Wildtypen im Vergleich zu Tag 4 deutlich zu und lag nun signifikant über den Vergleichswerten der mit sgp130Fc-injizierten Mäuse bzw. der transgenen sgp130Fc-Mäuse. Das relative Gewicht der rechten und linken inguinalen Lymphknoten nimmt von Tag 4 zu Tag 8 bei den unbehandelten und mit sgp130Fc-injizierten Wildtypen leicht zu. Bei den transgenen Mäusen ist eine deutliche Verringerung zu beobachten, so dass an Tag 8 ein signifikanter Unterschied zwischen mit sgp130Fc injizierten Tieren und den transgenen sgp130Fc-Mäusen für das relative Gewicht der inguinalen Lymphknoten festgestellt werden kann. Diese unterschiedliche Entwicklung der relativen Gewichte der betrachteten lymphatischen Organe kann als ein erster Hinweis auf unterschiedliche Entzündungsprozesse bei den drei Maustypen im Rahmen der DSS-Colitis gesehen werden.

Auf der Basis von Kolonüberständen konnte mittels ELISA die Konzentration von sgp130Fc im Darm zu verschiedenen Entzündungszeitpunkten bestimmt werden. Hierbei zeigte sich bei den transgenen wie bei den mit sgp130Fc injizierten Mäusen, im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp, ein deutlich erhöhtes Konzentrationsniveau von sgp130Fc im Darm. An Tag 4 war die Konzentration von sgp130Fc bei den transgenen und sgp130Fc-injizierten Mäusen vergleichbar. Auch an Tag 8 zeigten diese beiden Maustypen eine höhere sgp130Fc-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp, wobei die transgenen Mäuse jedoch eine signifikant höhere Konzentration im Vergleich zu mit sgp130Fc injizierten Mäusen aufwiesen (Abb. 15). Während also die sgp130Fc-Serumkonzentration bei Injektion des sgp130Fc im Entzündungsprozess weitgehend konstant bleibt, reagieren die transgenen sgp130Fc-Mäuse im fortschreitenden Entzündungsprozess mit einer weiteren deutlichen Erhöhung der sgp130Fc-Konzentration im Blut. Auch dies ist ein weiterer Hinweis auf eine veränderte Immunreaktion bei den transgenen Tieren im Rahmen der DSS-Colitis.

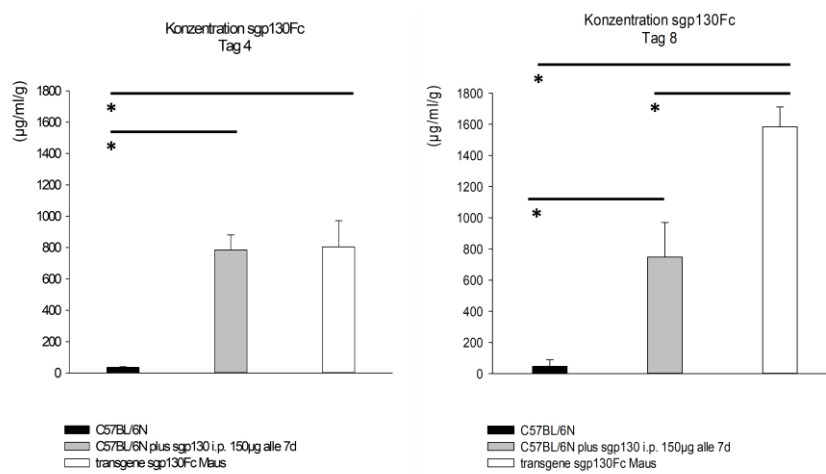


Abb. 15: Vergleich der sgp130-Konzentration in der Mukosa an Tag 4 und 8 bei DSS-Kolitis (DSS-Gabe 5 Tage mit 3%) zwischen unbehandelten und mit sgp130-Fc injizierten C57BL/6N- Mäusen und transgenen sgp130Fc-Mäusen (-* = signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$)

3.1.3. Histologische Veränderungen in der DSS-Colitis

3.1.3.1. Vergleich zum Zeitpunkt der frühen und späten Regeneration

Ein erster Vergleich der Histologie des Darms erfolgte über die Betrachtung der Kolonrollen (swiss-rolls) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Zur Einschätzung der Regeneration des Kolons nach DSS-Colitis wurden im Rahmen der Versuchsreihe DSS-1 und DSS-2 für die beiden Maustypen, C57BL/6N und die transgenen sgp130Fc-Mäuse, jeweils 3 Untergruppen gebildet. Eine Untergruppe wurde an Tag 6 bzw. 7 getötet und hinsichtlich des Entzündungsbildes im Kolon analysiert, die beiden anderen Gruppen entsprechend an den Tagen 14 und 21.

Die qualitative Analyse der Intensität der Entzündung des Kolons für die verschiedenen Subpopulationen der beiden Maustypen basiert auf dem Histologie-Score nach Rachmilewitz, der das Ausmaß der Zerstörung in den vier Schichten der Darmschicht (Epithel, Mukosa, Submukosa und Serosa) getrennt bewertet und in einer Maßzahl zusammenfaßt²⁰. Ein Vergleich dieser Score-Werte für die verschiedenen Messpunkte zeigte für beide Maustypen die zu erwartende Regeneration des Kolons, es konnten jedoch in dieser qualitativen Betrachtungsweise keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Maustypen beobachtet werden.

Daher wurde zusätzlich für die Vergleichsgruppen mit Betrachtungszeitpunkt am Tag 21 nach Entzündungsstart eine explizite Messung der Länge der Ulzerationen auf Basis der Kolonrollen durchgeführt. In diesem quantitativen Vergleich zeigte sich eine große Streuung in der Ulzervationslänge bei beiden Maustypen. Zwar konnte bei den Wildtypen im Schnitt ein leicht niedrigeres Ulzervationsniveau als bei den transgenen sgp130Fc-Mäusen beobachtet werden, die Unterschiede sind jedoch aufgrund der großen Streuung innerhalb der Maustypen nicht signifikant.

Insoweit kann die verzögerte Regeneration der transgenen sgp130Fc-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen, wie sie in der klinischen Symptomatik beobachtet wurde, in der histologischen Betrachtung nicht als statistisch signifikantes Ergebnis bestätigt werden (Abb. 16).

²⁰ Das Bewertungsschema ist in den Methoden (Kap. 2.4.1) ausführlich beschrieben. Zusätzlich sind repräsentative Beispiele im Anhang dargestellt.

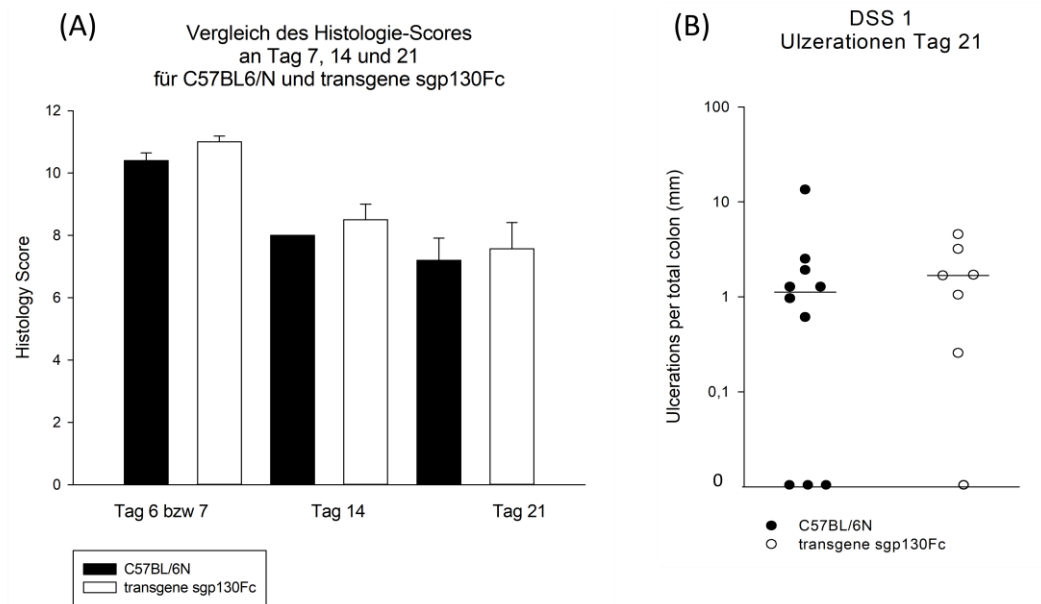


Abb. 16: A: Histologische Beurteilung der Darmschädigung im Rahmen der DSS-Kolitis bei transgenen sgp130Fc-Mäusen und C57BL/6N Wildtypen aus DSS-1 und DSS-2 zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 6 bzw. 7, 14, 21) im Entzündungsverlauf auf Basis des Histologie-Scores von Rachmilewitz
 B: Ulzerationsmessungen für den Gesamtdarm der Versuchstiere aus DSS-1 am Tag 21

3.1.3.2 Vergleich in der aktiven Entzündungsphase

Am Tag 4 sind noch keine signifikanten Unterschiede in der Entzündungsreaktion über die vier Darmschichten zu beobachten:

- Bei allen betrachteten Tieren war die Serosa zu diesem Zeitpunkt noch vollkommen intakt.
- Die Submukosa der transgenen sgp130Fc-Mäuse und der Wildtypen war teilweise deutlich von Entzündungszellen infiltriert. Die mit sgp130Fc injizierten Mäuse zeigten nur eine geringe Infiltration.
- In der Mukosa fand sich bei allen drei Maustypen eine teilweise starke Infiltration von Entzündungszellen. Zu diesem Zeitpunkt liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Maustypen, bezogen auf die in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung sichtbare Entzündungsreaktion, vor.
- Das Epithel ist an Tag 4 noch bei allen Versuchstieren in so weit intakt, dass keine Ulzerationen beobachtet werden können. Bei allen drei Maustypen ist bei einzelnen Tieren ein moderater bis teilweise vollständiger Verlust der Krypten zu beobachten. Hierbei waren große Unterschiede im Ausmaß des Epithelschadens innerhalb der Maustypen zu beobachten.
- Der qualitativ bewertende Histologie-Score von Rachmilewitz ergab an Tag 4 nach Start der DSS-Gabe keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Maustypen.

Auf dem Höhepunkt der Entzündungsreaktion an Tag 8 stellt sich das Bild differenzierter dar:

- Die Infiltration von Entzündungszellen in die Serosa blieb generell die Ausnahme und war nur bei zwei Versuchstieren zu beobachten, während die Submukosa und Mukosa bei allen Tieren Bereiche starker Infiltration aufwiesen.
- Praktisch alle betrachteten Versuchstiere aus DSS-3 und DSS-5, mit Ausnahme der sgp130Fc injizierten Tieren aus der Versuchsreihe DSS-5, zeigten eine starke Schädigung des Epithels mit Ulzerationen.

Da der hier verwendete Rachmilewitz-Score die Infiltration von Entzündungszellen in allen vier einzelnen Schichten der Darmwand, nicht jedoch die Intensität der Ulzerationen des Epithels, schwerpunktmäßig abbildet, ergaben sich auch hier für diesen Histologie-Score keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Maustypen. Der hier durch einen Anstieg des Scores qualitativ abgebildete Zuwachs an Entzündungsintensität von Tag 4 auf Tag 8 fiel somit bei allen betrachteten Maustypen vergleichbar aus, wie in Abb. 17 für die Versuchsreihe DSS-3 beispielhaft dargestellt ist.

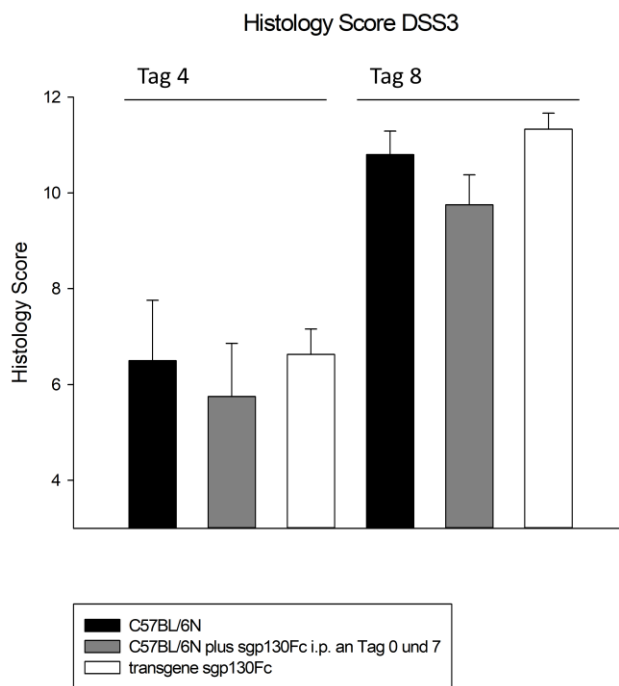


Abb. 17

Vergleich des Rachmilewitz-Scores zur qualitativen Beurteilung der Entzündungsintensität an Tag 4 und 8 für mit und ohne sgp130Fc injizierte C57BL/6N und transgene sgp130Fc-Mäuse bei DSS-Colitis

Das quantitative Ausmaß der Ulzerationen war jedoch zwischen den Maustypen an Tag 8 sehr unterschiedlich. Die in Abb. 18 dargestellten Kolonrollen der verschiedenen Maustypen an Tag 8 der DSS-Colitis sollen dies beispielhaft illustrieren: Während sich die Ulzerationen nach Injektion von sgp130Fc an Tag 8 der DSS-Colitis auf kleinere Bereiche beschränkten bzw. im hier dargestellten Ausnahmefall überhaupt nicht auftraten, zeigten die entsprechenden Wildtypen doch vereinzelte Ulzerationsbereiche größerer Länge. Die transgenen sgp130Fc-Mäuse zeigten häufig längere Ulzerationsstrecken, speziell am distalen Kolon.

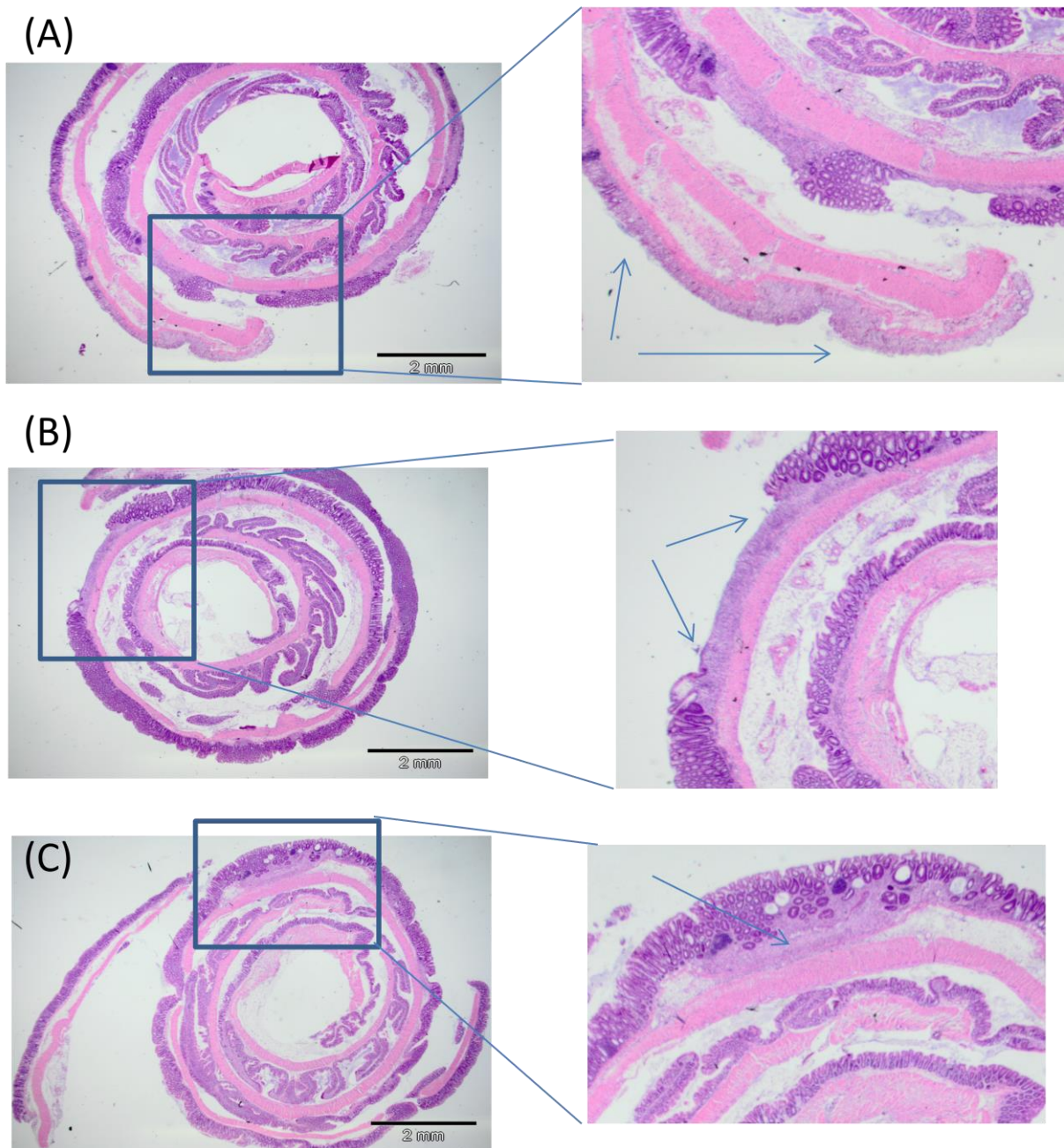


Abb. 18: Typische Beispiele der Entzündungsmuster nach DSS-Gabe an Tag 8 aus Versuchsreihe DSS-3 für
 (A) eine transgene *sgp130-Fc*-Maus: große Ulcerationen im kolo-rektalen Bereich
 (B) einen Wildtyp C57BL/6N: Ulcerationen mit Infiltration von Mukosa und Submukosa
 (C) *sgp130Fc* injizierten Wildtyp: Infiltration von Mukosa und Submukosa bei hier noch intaktem Epithel

Es zeigt sich zusammenfassend für die mit sgp130Fc injizierten Tiere ein niedriges Ausmaß an Ulzerationen, wobei jedoch fast kein Versuchstier in allen drei Versuchsreihen komplett ulzerationsfrei war. Bei den Wildtypen war im Vergleich zu den injizierten Tieren nur eine leicht erhöhte Ulzerationsneigung zu beobachten, jedoch führte eine Anzahl von Wildtypen mit stark ausgeprägter Ulzeration zu einem insgesamt höheren Ulzerationsdurchschnitt. Signifikante Unterschiede zwischen den Durchschnitten der gemessenen Ulzerationen lassen sich zwischen diesen beiden Maustypen nicht beobachten.

Die größte Bandbreite in den gemessenen Ulzerationslängen zeigt sich bei den transgenen sgp130Fc-Mäusen. In jeder Versuchsreihe waren aber sowohl Tiere mit sehr starker Ulzeration als auch Tiere mit niedriger Ulzeration anzutreffen. Auch wenn der Durchschnitt der Ulzerationen bei den transgenen sgp130Fc-Mäusen oberhalb von denen der beiden anderen Maustypen liegt, lässt sich jedoch aufgrund der hohen Streuung der Ulzerationen beim transgenen Typ keine signifikante Aussage über Ulzerationsunterschiede ableiten und es verbleibt nur eine stabile Tendenz zugunsten einer niedrigeren Ulzerationsneigung bei Injektion von sgp130Fc (Abb. 19).

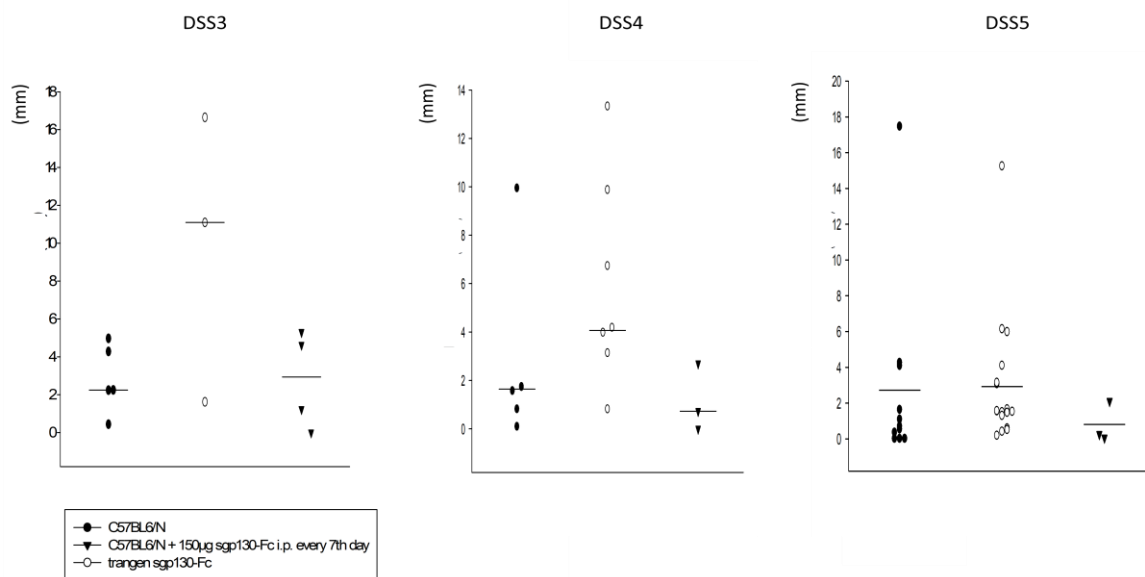


Abb.19: Gesamtlänge der Ulzerationen im Kolon (in mm) an Tag 8 nach DSS-Gabe in DSS-3 – DSS-5

Einen ersten Hinweis auf mögliche Unterschiede in der frühen Immunreaktion zwischen den betrachteten Maustypen lieferte eine histologische Färbung für Makrophagen (F4/80) in der Versuchsreihe DSS-3 an Tag 4 : Der Wildtyp (A) zeigte in Entzündungsregionen die stärkste Konzentration von Makrophagen, eine moderatere Ausprägung zeigte der Typ der transgenen sgp130Fc-Maus (B), während beim mit sgp130Fc injizierten Wildtyp (C) praktisch keine Makrophagen sichtbar sind (Abb. 20).

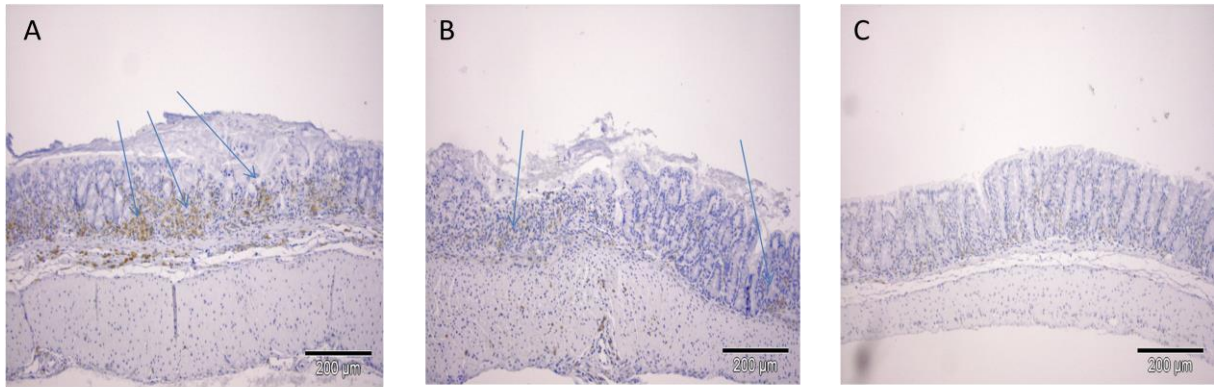


Abb 20: Makrophagenfärbung von beispielhaften Entzündungsregionen des Kolons an Tag 4 der DSS-Colitis für
 (A) Wildtyp C57BL/6N: hohe Anzahl an Makrophagen (braun gefärbte Zellen) in Mukosa und Submukosa
 (B) transgenen sgp130Fc-Typ: sehr vereinzelte Makrophagen in Mukosa und Submukosa
 (C) mit sgp130Fc injizierten Wildtyp: keine deutliche Färbung von Makrophagen sichtbar.

Diese histologische Betrachtung kann jedoch nur einen ersten qualitativen Hinweis auf unterschiedliche Zellpopulationen in den Immunreaktionen der verschiedenen Maustypen geben. Auf eine quantitative Betrachtung der Histologie mittels Auszählung der jeweils angefärbten Zellen wird aufgrund der zu großen Willkürlichkeit bei Auswahl der entsprechenden Regionen und der damit verbundenen eingeschränkten Aussagekraft verzichtet. Eine quantitative Analyse der verschiedenen Immunzellpopulationen ist jedoch mit Hilfe der Durchflusszytometrie möglich, auf deren Ergebnisse im Folgenden eingegangen werden soll.

3.1.4 Entwicklung von Granulozyten, Makrophagen und T-Zellen auf Basis einer Analyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Um die Bedeutung der einzelnen Immunzelltypen im Rahmen des Entzündungsvorgangs und ihre quantitative Entwicklung beurteilen zu können, wurde zunächst die Ausgangssituation an Tag 0 vor Gabe von DSS und Injektion von sgp130Fc bei dem Wildtyp (C57BL/6N) mit der bei den transgenen sgp130Fc Mäusen verglichen. Dabei zeigte sich eine höhere Konzentration in den isolierten Leukozyten (CD45+) für CD3+ Zellen (T-Zellen) beim Wildtyp (Abb. 21).

Hinsichtlich der sonstigen betrachteten Immunzellen (CD4-T-Zellen, zytotoxische T-Zellen (CD8a), Monozyten und Granulozyten (CD11b, Ly6G) dendritischen Zellen (CD11c) sowie B-Zellen (B220)) ergab sich als Ausgangssituation, also bevor in eine Teilgruppe der Wildtypen sgp130Fc injiziert wurde und vor Gabe von DSS ins Trinkwasser, kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtypen (C57BL/6N) und den transgenen sgp130Fc-Mäusen. Auch war die Zahl der gemessenen Immunzellpopulationen, bei noch fehlender Entzündung, sowohl bei den Wildtypen als auch bei den transgenen sgp130Fc-Mäusen sehr gering. Dies galt auch für die Makrophagen (F4/80), wie in Abb. 22 beispielhaft dargestellt. Insoweit können die nun an Tag 4 bzw. 8 ermittelten Unterschiede in den Immunzellpopulationen, die in ihrem prozentualen Anteil an den

gesamten Leukozyten (CD45) verglichen werden, als unterschiedliche Reaktion auf die DSS-Gabe gesehen werden.

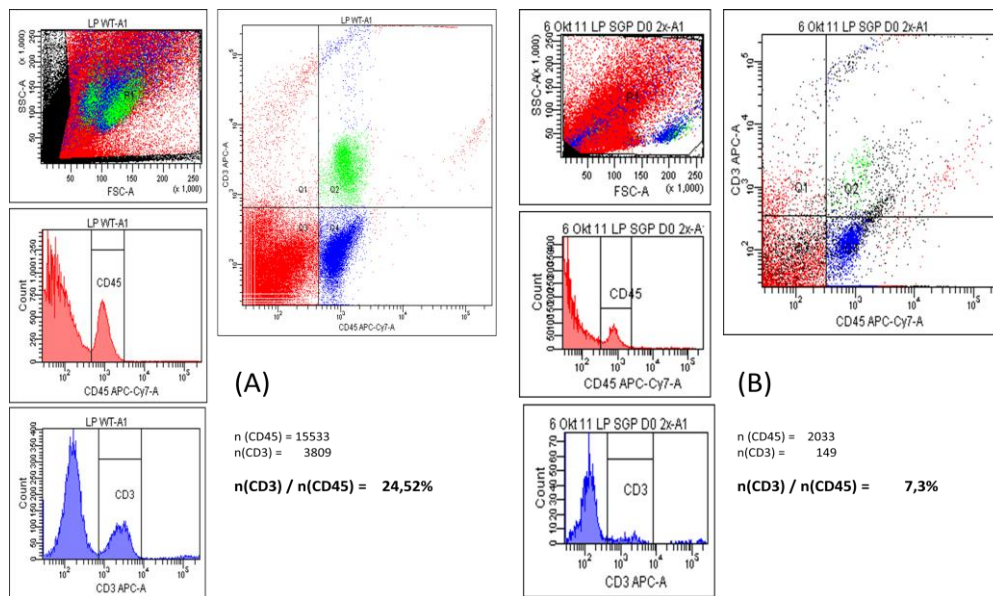


Abb.21: Vergleich der T-Zellanteile an den Leukozyten an Tag 0 (vor DSS-Gabe) auf Basis einer Facsanalyse für (A) den Wildtyp: ca. 25% aller Leukozyten CD3 positiv (B) den transgenen sgp130Fc: im Vergleich niedrigerer Anteil CD3 positiver Leukozyten

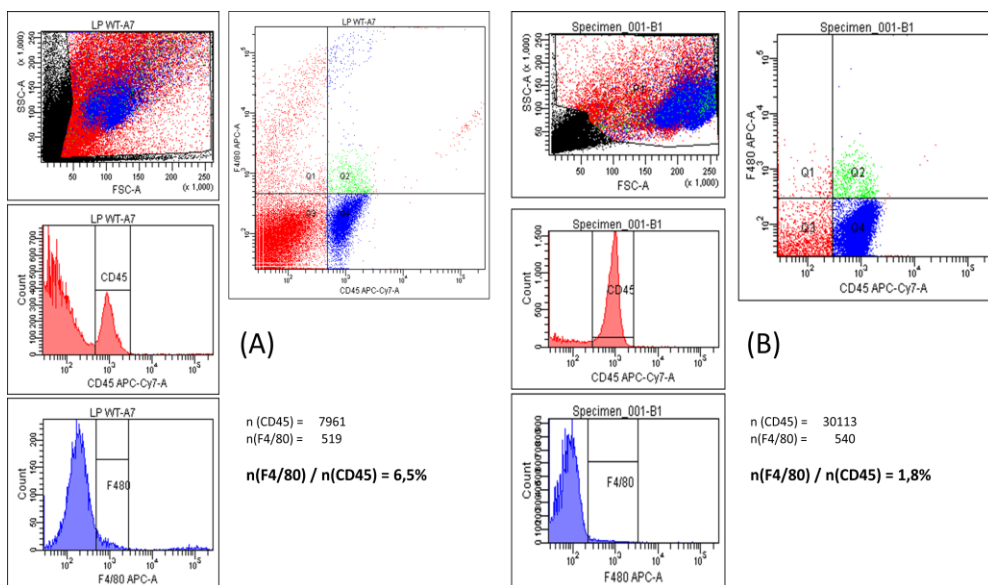


Abb.22: Vergleich der Makrophagenanteile an den Leukozyten an Tag 0 (vor DSS-Gabe) auf Basis einer Facsanalyse für (A) den Wildtyp: kaum F4/80 positive Zellen (B) den transgenen sgp130Fc-Typ: kaum F4/80 positive Zellen

Am Tag 4 nach DSS-Gabe zeigten sich nun für die drei unterschiedlichen Maustypen Hinweise auf Unterschiede in der Entzündungsreaktion. Zunächst wurde bei allen Tieren ein deutlicher Anstieg an Granulozyten (CD45+Ly6G+) beobachtet (Abb. 23).

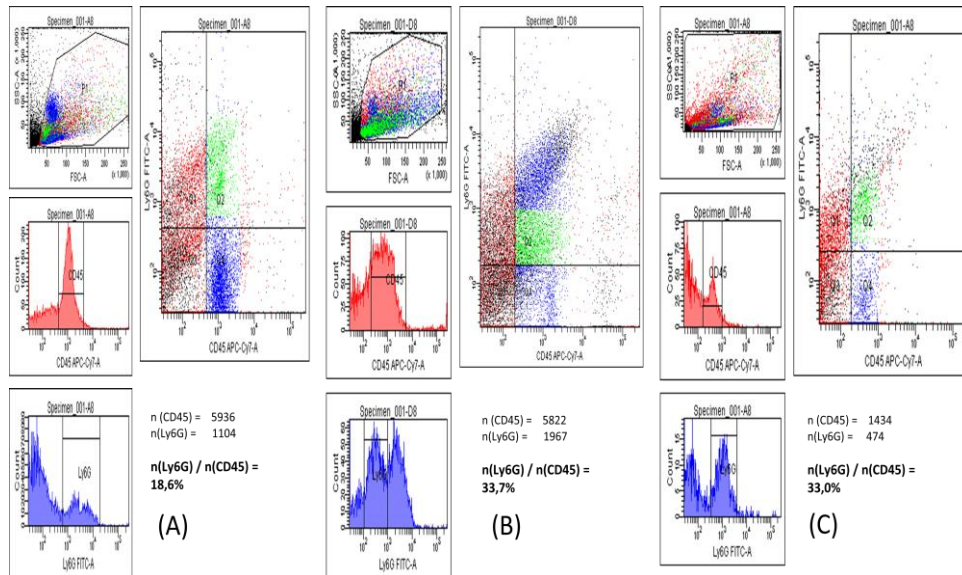


Abb. 23: Vergleich der prozentualen Anteile der Granulozyten (Ly6G) an den Leukozyten (CD45) an Tag 4 nach DSS-Gabe für den
 (A) Wildtyp: Anstieg nach DSS-Gabe
 (B) transgenen sgp130Fc-Typ : starker Anstieg nach DSS-Gabe
 (C) mit sgp130Fc injizierten Wildtyp: starker Anstieg nach DSS-Gabe

Der Anstieg an Makrophagen fällt unterschiedlich aus:

Der nicht mit sgp130Fc injizierte Wildtyp (C57BL/6N) zeigte bereits an Tag 4 nach DSS-Gabe einen deutlichen Anstieg der Makrophagen. Die transgenen sgp130Fc-Mäuse wiesen diese Zunahme an Makrophagen jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht auf: Durch die hohe Serumkonzentration von sgp130Fc ist bei diesen Mäusen das Transsignaling von IL-6 blockiert, so dass eine Rekrutierung von Makrophagen in vergleichbarem Umfang zum frühen Zeitpunkt (Tag 4) unterbleibt. Gleiches ist auch für die mit sgp130Fc injizierten Mäuse zu beobachten. Auch hier findet keine zum nicht injizierten Wildtyp vergleichbare Rekrutierung von Makrophagen statt, wie beispielhaft in Abb. 24 dargestellt ist.

Insoweit bestätigt sich die Momentaufnahme aus der Histologie, die auch für den unbehandelten Wildtyp eine erhöhte Konzentration von Makrophagen in der Schleimhaut aufzeigte (Abb. 20).

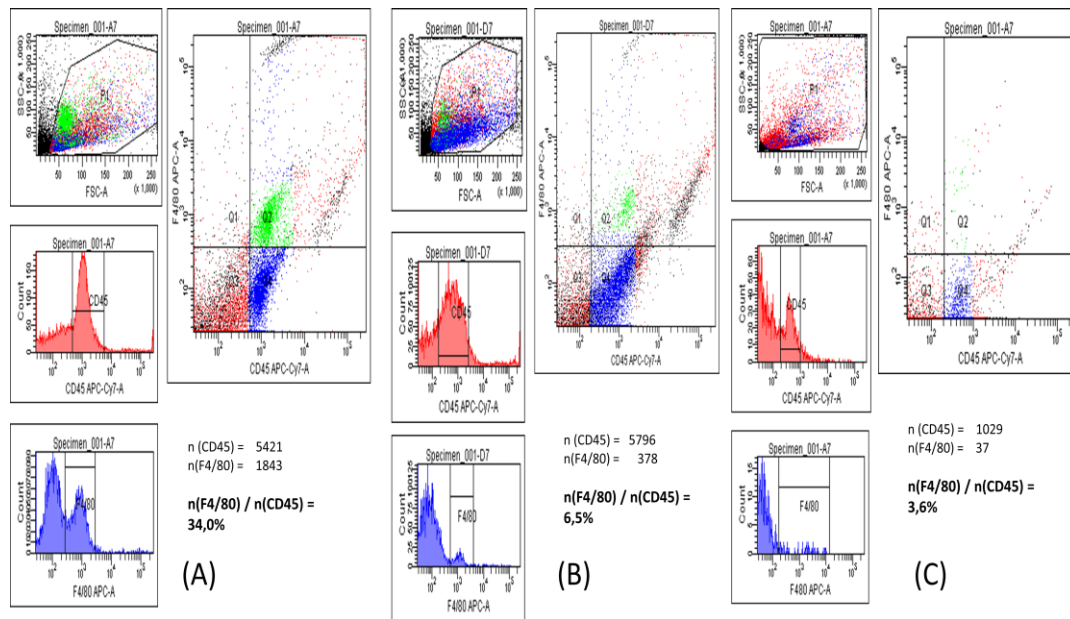


Abb. 24: Vergleich der prozentualen Anteile der Makrophagen (F4/80) an den Leukozyten (CD45) an Tag 4 nach DSS-Gabe für den
 (A) Wildtyp: deutlicher Zuwachs an Makrophagen
 (B) transgenen sgp130Fc-Typ: moderater Zuwachs an Makrophagen
 (C) mit sgp130Fc injizierten Wildtyp: praktisch kein Makrophagenanstieg

In einem anderen Entzündungsmodell konnte gezeigt werden, dass IL-6 sowohl Einfluss auf die Menge, als auch auf die Art dieser Makrophagen im Rahmen einer Entzündungsreaktion hat.²¹ Rabe zeigte, dass Makrophagen im Rahmen einer Entzündung nach proteolytischer Abspaltung (Shedding) von IL-6R von angelockten Granulozyten über den Signalprozess des IL-6 Transsignalings zur Entzündungsstelle rekrutiert werden (Rabe, Chalaris et al. 2008). Diese beschriebene Immunreaktion scheint sich auch im vorliegenden DSS-Colitismodell zu bestätigen: Durch die Blockade des Transsignalings mittels sgp130Fc waren bei den transgenen sgp130Fc-Mäusen und den mit sgp130Fc-injizierten Wildtypen an Tag 4 nach DSS-Gabe deutlich weniger Makrophagen zu beobachten als bei den vergleichbaren Wildtypen.

Eine nähere Betrachtung der Lymphozyten, speziell der B-Zellen (B220) und T-Zellen (CD3) und hier insbesondere der CD4-T-Zellen sowie der zytotoxischen T-Zellen (CD8a), ergab auch nach wiederholten FACS-Analysen, bei teilweise begrenzten Zellzahlen, keine Hinweise auf aussagefähige Unterschiede zwischen den drei Maustypen zu diesem frühen Entzündungszeitpunkt. Daher wurde abschließend die Entwicklung der Immunzellen an Tag 8 nach Start der DSS-Gabe, also zum Zeitpunkt der maximalen klinischen Entzündungssymptomatik, betrachtet.

Zunächst war an Tag 8 eine deutliche Reduktion der Granulozyten bei den Wildtypen zu beobachten. Ihr Anteil an den Leukozyten verringerte sich im Vergleich zu Tag 4 um 30%. Bei den transgenen sgp130Fc-Mäusen fiel diese Reduktion vergleichbar, aber etwas moderater aus. Der deutlichste Unterschied ergab sich beim mit

²¹Die Entzündung wurde in diesem Modell durch intraperitoneale Gabe von Lipopolysaccharid induziert. IL-6 unterdrückte in diesem Entzündungsmodell zusammen mit IL-4 die Rekrutierung von M1-Makrophagen aus dem Blut und verstärkte gleichzeitig die IL-4 vermittelte Phosphorylierung von STAT6, die zusammen mit IL-4 über eine alternative Aktivierung von M2-Makrophagen zu einer Verschiebung der Makrophagenpopulation mit erhöhtem Anteil an M2-Makrophagen führte (Mauer, Chaurasia et al. 2014).

sgp130Fc injizierten Wildtyp, der an Tag 8 im Vergleich zum Tag 0 praktisch keine erhöhten Anteile von Granulozyten an den Leukozyten mehr aufweist. Dies kann als Indiz gesehen werden, dass hier zu diesem Zeitpunkt bei Injektion von sgp130Fc die akute Phase der Entzündung bereits abgeschlossen ist (Abb. 26). Dieses Ergebnis korrespondiert gut mit den klinischen Beobachtungen, wo nach Tag 8 auch bei den Wildtypen und transgenen Mäusen der Start des Regenerationsprozesses beobachtet werden konnte. Der Prozess der Regeneration scheint jedoch, ausgehend von den klinischen Symptomen der Entzündung bei den mit sgp130Fc injizierten Mäusen, bei insgesamt deutlich geringerer Intensität der Entzündung, zu diesem Zeitpunkt schon fast abgeschlossen zu sein.

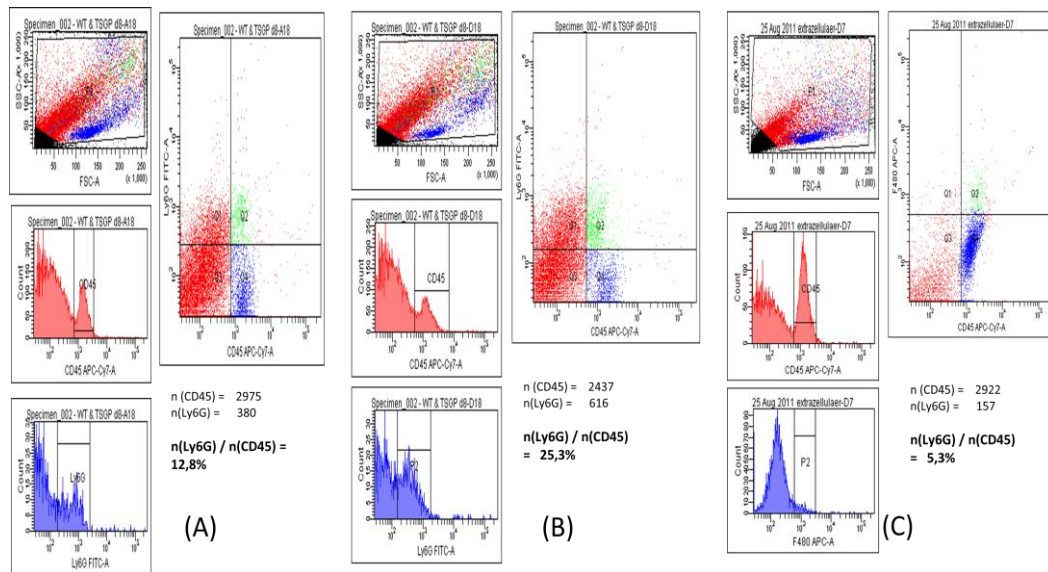


Abb. 25: Vergleich der prozentualen Anteile der Granulozyten (Ly6G) an den Leukozyten (CD45) an Tag 8 nach DSS-Gabe für den
 (A) Wildtyp : deutlicher Rückgang des Anteils der Granulozyten
 (B) transgenen sgp130Fc-Typ : moderater Rückgang des Anteils der Granulozyten
 (C) mit sgp130Fc injizierten Wildtyp: deutlichster Rückgang der Granulozyten

Eine nähere Betrachtung des prozentualen Anteils der Makrophagen an den Leukozyten an Tag 8 zeigte weitere Unterschiede auf. Während der Anteil der F4/80+ - Zellen an den Leukozyten bei den Wildtypen von Tag 4 zu Tag 8 wieder auf Normalniveau (vergleichbar Tag 0) abnahm, war bei den transgenen sgp130Fc-Mäusen eine weitere Zunahme zu beobachten, so dass die transgenen Mäuse an Tag 8 einen deutlich höheren prozentualen Anteil von F4/80+ Zellen an den Leukozyten aufwiesen als die Wildtypen. Für die mit sgp130Fc injizierten Tiere ist zu diesem Zeitpunkt, vergleichbar den Wildtypen, kein nennenswert erhöhter Anteil von Makrophagen an den Leukozyten messbar (Abb. 26).

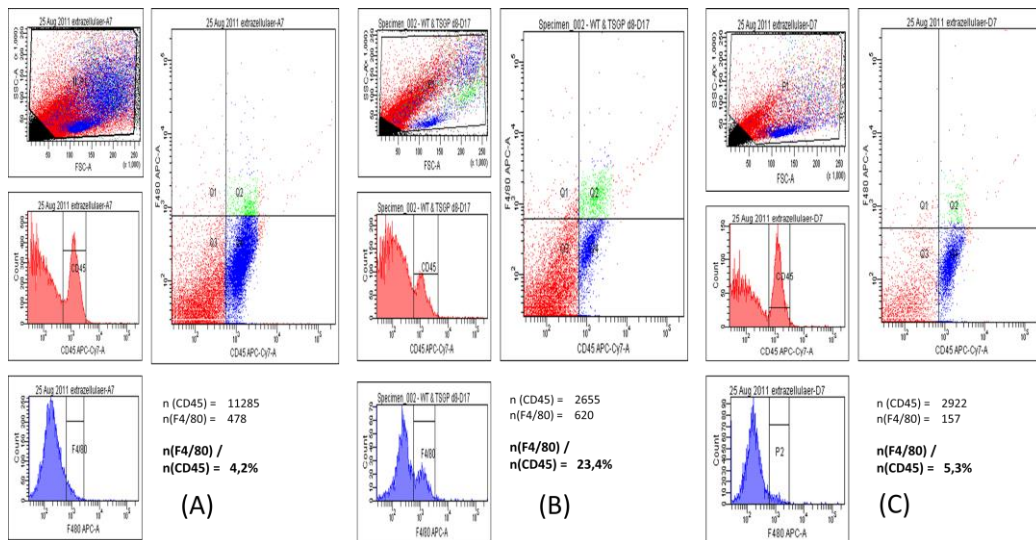


Abb. 26: Vergleich der prozentualen Anteile der Markophagen (F4/80) an den Leukozyten (CD45) an Tag 8 nach DSS-Gabe für den
 (A) Wildtyp: Makrophagenanteil wieder auf Niveau wie vor Entzündung
 (B) transgenen sgp130Fc-Typ: weiterer Zuwachs des Makrophagenanteils an Leukozyten
 (C) mit sgp130Fc injizierten Wildtyp: Makrophagenanteil wie vor Entzündung

In der Zusammenfassung der dargestellten Analysen mit Hilfe der Durchflusszytometrie läßt sich festhalten: Alle drei Maustypen zeigen eine unterschiedliche Immunreaktion auf die DSS-Gabe: Beim Wildtyp steht der frühe Einstrom an Granulozyten im Vordergrund, der auch zu einem frühen Zeitpunkt zu einer hohen Rekrutierung an Makrophagen führt. Diese Rekrutierung ist bei den transgenen sgp130Fc-Mäusen nur in moderater Form zu sehen, sie setzt sich allerdings nach Tag 4 kontinuierlich fort. Bei Injektion von sgp130Fc ist zwar auch ein Einstrom von Granulozyten an Tag 4 sichtbar, eine zu den beiden anderen Maustypen vergleichbare Rekrutierung von Makrophagen bleibt jedoch aus.

3.1.5 Zusammenfassung

Im Rahmen der DSS-Colitis zeigten die transgenen sgp130Fc-Mäuse eine signifikant höhere Gewichtsreduktion, als sie bei den mit sgp130Fc injizierten Mäusen und Wildtypen zu beobachten war. Histologisch waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Maustypen zu beobachten.

In der Durchflusszytometrie und Histologie konnten Unterschiede in der Makrophagenentwicklung an Tag 4 und Tag 8 nach Start der DSS-Gabe beobachtet werden:

- Für mit sgp130Fc injizierte Mäuse erhöhte sich der Anteil der Makrophagen an den Leukozyten im gesamten Entzündungsablauf kaum.
- Die Wildtypen zeigten einen deutlichen Anstieg der Makrophagen und Maximum an Tag 4.
- Die transgenen sgp130Fc-Mäuse wiesen, verzögert an Tag 8, den höchsten Anteil an Makrophagen bei den Leukozyten auf.

Eine Erklärungsmöglichkeit dieser Ergebnisse besteht in der Annahme eines veränderten Immunsystems aufgrund der dauerhaft erhöhten sgp130Fc-Konzentration bei den transgenen Tieren:

Durch die Injektion von sgp130Fc erfolgt die Blockade des IL-6-Transsignalings, so dass die durch proteolytische Abspaltung von Granulozyten gebildeten löslichen IL-6 Rezeptoren nicht mehr zu einer Erhöhung des Botenstoffes MCP1 und der dadurch ausgelösten Rekrutierung von proinflammatorischen Makrophagen aus dem Blut führen können (Rabe, Chalaris et al. 2008).²²

Diese Blockade in der Rekrutierung von Makrophagen scheint auch bei den transgenen Tieren zu erfolgen, da an Tag 4 ebenfalls ein Anstieg der Makrophagen im Vergleich zum Wildtyp ausbleibt. Der jedoch an Tag 8 beobachtbare Anstieg könnte auf einer lokalen Proliferation von antiinflammatorischen M2-Makrophagen beruhen, wie er bereits in anderen Entzündungsmodellen beschrieben ist (Jenkins, Ruckerl et al. 2011; Mauer, Chaurasia et al. 2014). So wäre nachvollziehbar, warum ein deutlicher Anstieg von Makrophagen bei den transgenen sgp130Fc-Mäusen an Tag 8 nicht zu einer signifikanten Verschlechterung der Colitis auf Basis der histologischen Untersuchungen führt.

²² Es wurden alternative Wege der Makrophagenrekrutierung in der DSS-Colitis beschrieben, die unter anderem auch auf einer Vermehrung von IL-17 beruhen (Ito, Kita et al. 2008), jedoch immer über den Botenstoff MCP1 zur Makrophagenrekrutierung führen.

3.2 Vergleich von transgenen sgp130Fc-Mäusen und C57BL/6N-Wildtypen im DSS-AOM-Modell der Karzinogenese

3.2.1 Übersicht der Versuchsreihen

Um den Einfluss einer dauerhaft erhöhten Serumkonzentration von sgp130Fc auf die Darmkrebsentwicklung zu untersuchen, wurden, auf Basis des DSS-AOM-Modells, drei Versuchsreihen durchgeführt.

Das DSS-AOM-Modell ist, wie bereits in Kap. 2 beschrieben, ein Modell für eine entzündungsassoziierte Krebsentwicklung. Die Schädigung der epithelialen Schutzbarriere im Kolon durch die wiederholte Aufnahme von DSS über das Trinkwasser führt dabei zu einer forcierten chronischen Darmentzündung und zusammen mit dem Prokarzinogen Azoxymethan (AOM) zu Mutationen, die eine Tumorentwicklung induzieren. Eine stärkere Beeinträchtigung der Darmoberfläche durch DSS sollte daher auch in einer verstärkten Adenomentwicklung resultieren.

Die erste Versuchsreihe umfasste insgesamt 36 Tiere, jeweils 18 Wildtypen und 18 transgene sgp130Fc-Mäuse. Die Wildtypen enthielten 8 Tiere aus eigener und 10 Tiere aus einer weiteren institutsinternen Zucht, die sgp130Fc Mäuse entstammten der eigenen Zucht. Bei allen Typen handelte es sich um den gleichen Maustyp C57BL/6N. Alle Tiere wurden unter identischen Bedingungen (Viktor-Hensen-Haus) aufgezogen und gehalten. So wurden potentielle Einflüsse eines unterschiedlichen Mikrobioms aufgrund unterschiedlicher Herkunft, Zucht und Ernährung der Versuchstiere so weit wie möglich ausgeschlossen. Die Möglichkeit eines Unterschieds im Mikrobiom der verglichenen Wildtypen und transgenen Mäuse aufgrund der Veränderung des Genoms der transgenen Tiere bleibt jedoch weiterhin bestehen.²³

Die in der ersten Versuchsreihe verwendete Charge des Karzinogens AOM von Sigma Aldrich führte bei Einsatz in einem weiteren Krebsmodell im Unterschied zur hier beschriebenen Versuchsreihe zu einem frühzeitigen Tod der Versuchstiere. Die Ergebnisse bezüglich der Karzinogenese für die transgenen sgp130Fc-Mäuse in der hier beschriebenen Versuchsreihe waren jedoch bei weiteren Versuchsreihen mit einer anderen Charge AOM vergleichbar zu den hier beschriebenen Ergebnissen.²⁴

In der zweiten und dritten Versuchsreihe, die von Dr. Spehlmann als Kontrollreihe durchgeführt und in Zusammenarbeit mit dem Autor aufbereitet und ausgewertet wurde, wurden die Wildtypen von Charles-River bezogen und kurz nach Ankunft im Versuch eingesetzt. Hier ist folglich die Vergleichbarkeit zwischen diesen Wildtypen und den selbst gezüchteten transgenen Tieren im Vergleich zur ersten Versuchsreihe eingeschränkt. Während in der ersten Versuchsreihe mehr als 90% der untersuchten Tiere das Ende der Versuchsreihe erlebten, starben in der zweiten und dritten Versuchsreihe teilweise deutlich mehr als die Hälfte aller Wildtypen, obwohl im Laufe des Versuchs bereits abweichend vom Versuchsdesign die Dauer für die DSS-Gabe deutlich verringert wurde. Eine derartige Mortalität unter DSS-Gabe ist für den verwendeten Typ C57BL/6N

²³ Der Einfluss der gentechnischen Veränderungen bei transgenen Mausmodellen auf das Mikrobiom kann im Rahmen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen das Versuchsergebnis stark beeinflussen (Couturier-Maillard, Secher et al. 2013)

²⁴ Die entnommenen Kolonpräparate aus den Versuchsreihen 2 und 3 sind im Anhang dargestellt. Auch hier sind schon in der Blickdiagnose bei allen transgenen Tieren Tumore im Kolon vergleichbar zur Versuchsreihe 1 zu erkennen.

sehr untypisch und steht im Widerspruch zu einer Vielzahl von vergleichbaren Untersuchungen in der Literatur. Dies schränkt die Aussagen aus diesen Versuchsreihen mit den Wildtypen als Vergleichsmaßstab erheblich ein.

Aufgrund dieser sehr starken Einschränkungen in der Aussagefähigkeit der Ergebnisse bei den Wildtypen in den Versuchsreihen 2 und 3 wird sich hier primär auf die Darstellung der ersten Versuchsreihe beschränkt.

Die sgp130Fc Serumkonzentration der transgenen Mäuse schwankte in der hier betrachteten Versuchsreihe von 3,01 bis 16 µg/ml. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der sgp130Fc-Konzentration und dem beobachteten Tumorausmaß.

Die Tumorentwicklung von regelmäßig mit sgp130Fc injizierten Wildtypen ist hier nicht Gegenstand der Untersuchung. Da die Injektion von sgp130Fc schon im DSS-Modell zu einer deutlichen Reduktion bzw. Vermeidung der Colitis führte, ist im Rahmen des DSS-AOM-Modells nicht von einer signifikanten Tumorentwicklung durch AOM ohne die erleichterte Wirkungsbedingung durch DSS im hier betrachteten Zeitraum von 100 Tagen auszugehen. Zudem wurde bereits in anderen Studien des AOM-Modells die hemmende Wirkung von injiziertem sgp130Fc auf die Tumorentwicklung nachgewiesen (Becker, Fantini et al. 2004).

Studie	Ziel und Struktur	verwendete Maustypen	Anzahl	davon gestorben
DSS-AOM-1	Vergleich von C57BL/6N mit transgenen sgp130Fc-Mäusen, beide gezüchtet in gleichem Tierstall unter gleichen Bedingung , bezüglich Tumorprogression unter AOM-DSS gesamte Studienlänge: 103 Tage	C57BL/6N - Zucht: VHH	18	-
		tr. sgp130Fc - Zucht: VHH	18	3
DSS-AOM-2/3	Vergleich von C57BL/6N from Charles-River mit transgenen sgp130Fc (eigene Zucht), bezüglich Tumorprogression unter AOM-DSS – Einfluß eines unterschiedlichen Mikrobioms?			
DSS-AOM-2	gesamte Studienlänge: 115 Tage DSS Perioden (Tage): 7 - 5 - 3 mit 2%	C57BL/6N - Charles-River	17	12
		tr. sgp130Fc - Zucht : VHH	17	2
DSS-AOM-3	gesamte Studienlänge: 95 Tage DSS Perioden (Tage): 7 - 3 - 4 mit 2%	C57BL/6N - Charles-River	7	4
		tr. sgp130Fc - Zucht : VHH	7	3

Tabelle 2: Übersicht über die Versuchsreihen zur Darmkarziogenese DSS-AOM-1,2,3

3.2.2 Der Entzündungsverlauf unter DSS im Rahmen der Karzinogenese

In der vorherigen Analyse der DSS-Colitis wurde gezeigt, dass es signifikante Unterschiede in der klinischen Symptomatik zwischen transgenen sgp130Fc-Mäusen und den Wildtypen (C57BL/6N) gibt. Diese klinischen Unterschiede konnten aber nicht histologisch als statistisch signifikante Differenzen bestätigt werden.

Daher stellt sich Frage, ob die klinisch beobachteten Unterschiede in der Colitis und ihrer Regeneration ausreichen, um im DSS-AOM-Modell zu vergleichbaren signifikanten Unterschieden in der Karzinogenese zu führen, oder ob der Einfluss einer Blockade von IL-6 durch sgp130Fc auf die Karzinogenese ausreicht, die Effekte der Entzündungsunterschiede im Gesamtablauf der Krebsentwicklung zu kompensieren.

Betrachtet man die Gewichtsverläufe nach erster DSS-Gabe, so zeigt sich auch hier das schon bekannte Bild eines stärkeren Gewichtsverlustes bei den transgenen sgp130Fc Tieren im Vergleich zu den Wildtypen (Abb. 27).

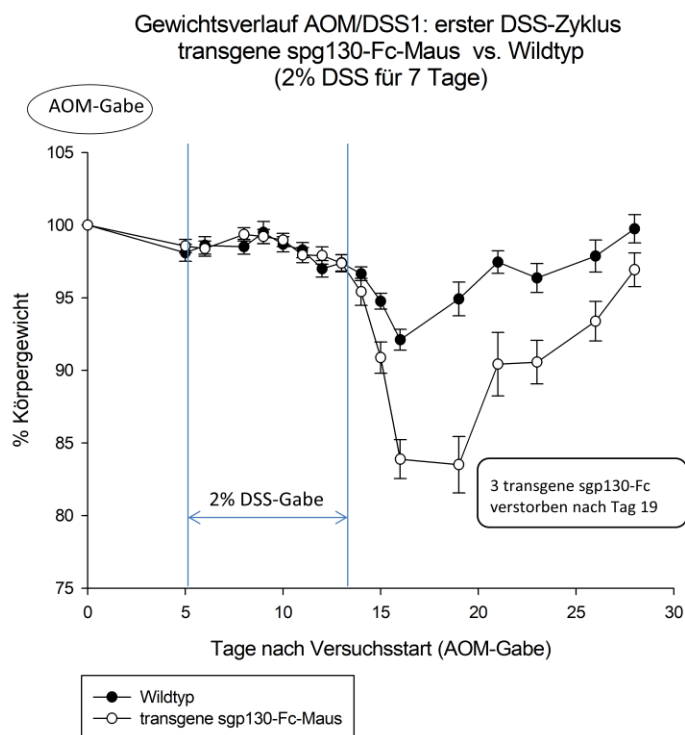


Abb. 27: Vergleich der Gewichtsentwicklung von transgenen sgp130Fc - Mäusen mit den Wildtypen (C57BL/6N) nach AOM Gabe an Tag 0 und 2% DSS-Gabe an Tag 5 für 7 Tage im Rahmen der Versuchsreihe AOM-DSS 1

Der zu Beginn dieser Versuchsreihe beobachtete Gewichtsverlauf ist vergleichbar mit den Ergebnissen aus den DSS-Colitis-Versuchsreihen. Es zeigte sich eine deutlich stärkere Gewichtsabnahme in diesem Fall nach 10 bzw. 11 Tagen nach Start der DSS-Gabe für die transgenen sgp130Fc Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen.²⁵

²⁵ Ausgehend von einer konstanten täglichen Trinkmenge entspricht die Aufnahme von 3% DSS über das Trinkwasser für 5 Tage ungefähr der analogen Aufnahme von 2% DSS für 7 Tage. Ein potentieller Einfluss auf den Gewichtsverlauf durch die AOM-Gabe 5 Tage nach Erstapplikation kann vernachlässigt werden.

3.2.2 Ergebnisse der Karzinogenese

Nach 103 Tagen erfolgte die Tötung der Tiere und Entnahme des Kolon zur Photographie und weiteren histologischen Aufarbeitung als sogenannte Kolonrolle. Ferner wurden auch weitere Organe (Leber, Milz, Lymphknoten) entnommen und gewogen. Eine erste makroskopische Betrachtung des Kolons der jeweiligen Versuchstiere in den zwei Vergleichsgruppen zeigt sowohl für die Wildtypen als auch für die transgenen sgp130Fc-Mäuse eine deutliche Entwicklung von Adenomen im Kolon. Da diese makroskopische visuelle Betrachtung (Abb. 28) jedoch leicht zu Fehlschlüssen hinsichtlich des tatsächlichen Ausmaßes der Krebsentwicklung bei den betrachteten Tieren führt, soll die folgende Abbildung nur zur Illustration und Vollständigkeit aufgeführt werden. Eine vergleichende Bewertung der Entwicklung der Adenome kann ausschließlich auf Basis der histologischen Bewertungen und Messungen erfolgen.

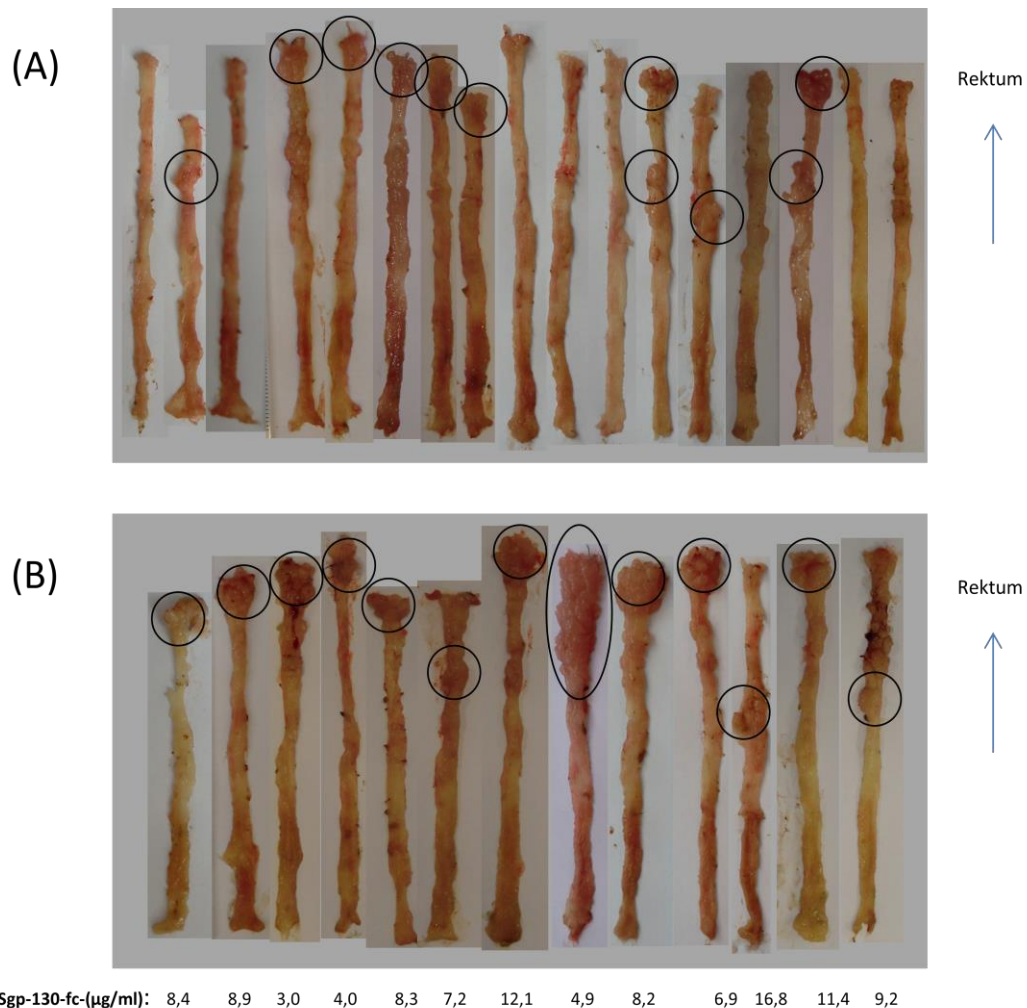


Abb. 28: Kolonentnahme nach 103 Tagen im Rahmen der Versuchsreihe AOM-DSS-1 für
(A) die Wildtypen: deutliche Tumorbildung bei vielen Versuchstieren sichtbar
(B) transgenen sgp130Fc-Mäuse: deutliche Tumorentwicklung sichtbar, im kolorektalen Bereich, keine Korrelation von makroskopischem Tumorausmaß und sgp130Fc-Konzentration

Im Kolon aller transgenen sgp130Fc-Mäuse war ohne Ausnahme eine deutliche Tumorentwicklung sichtbar. Dabei bestand keine Korrelation zwischen dem Grad der Tumorentwicklung und der sgp130-Serumkonzentration. Bedingt durch die höhere Schwankungsbreite bei den Wildtypen fällt die durchschnittliche Intensität der Tumorentwicklung bei den transgenen sgp130Fc-Mäusen tendenziell etwas höher aus.

Ein vergleichbares Bild zeigte die Koloskopie von ausgewählten Versuchstieren. Generell zeigten beide Maustypen eine deutliche Tumorausprägung wie in Abb. 29 beispielhaft dargestellt ist. Tendenziell war auch hier im Bereich des Sigma und Rektums bei der transgenen sgp130Fc-Maus eine stärkere Tumorausprägung zu beobachten, wobei diese Vergleichsaussage keinen statistischen Anspruch erheben kann. Eine genauere Analyse kann jedoch durch die Histologie erfolgen.

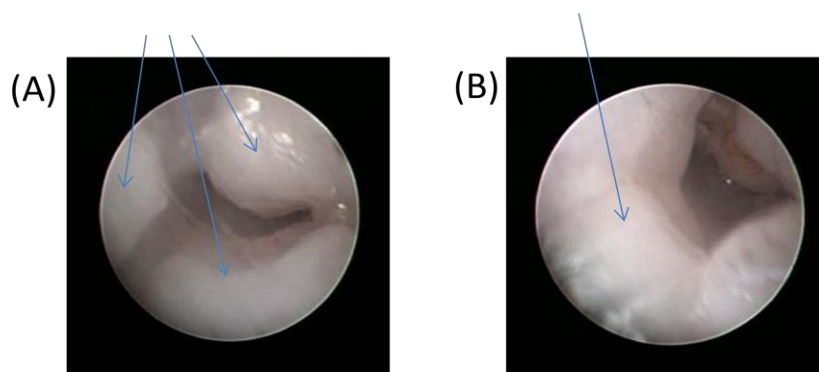


Abb. 29: Beispielhafte Aufnahmen einer Koloskopie aus dem Sigma-Rektumbereich im Rahmen der Versuchsreihe AOM-DSS-1 vom

- (A) Wildtyp C57BL/6N: deutliche Ausprägung einzelner Tumore
- (B) transgenen sgp130Fc-Maus: konfluierende Tumormasse mit deutlicher Stenosierung des Lumens

Die histologische Auswertung der Versuchsreihe 1 zeigte, dass das Ausmaß der Tumorentwicklung bei den transgenen sgp130Fc-Mäusen eine stärkere Streuung aufwies als bei den nichtbehandelten Wildtypen. Bei beiden Maustypen war teilweise ein deutliches Ausmaß an Adenomen zu messen. Zur weiteren Illustration sind zwei Kolonrollen mit deutlicher Ausprägung von Adenomen für die beiden Maustypen in Abbildung 34 dargestellt.

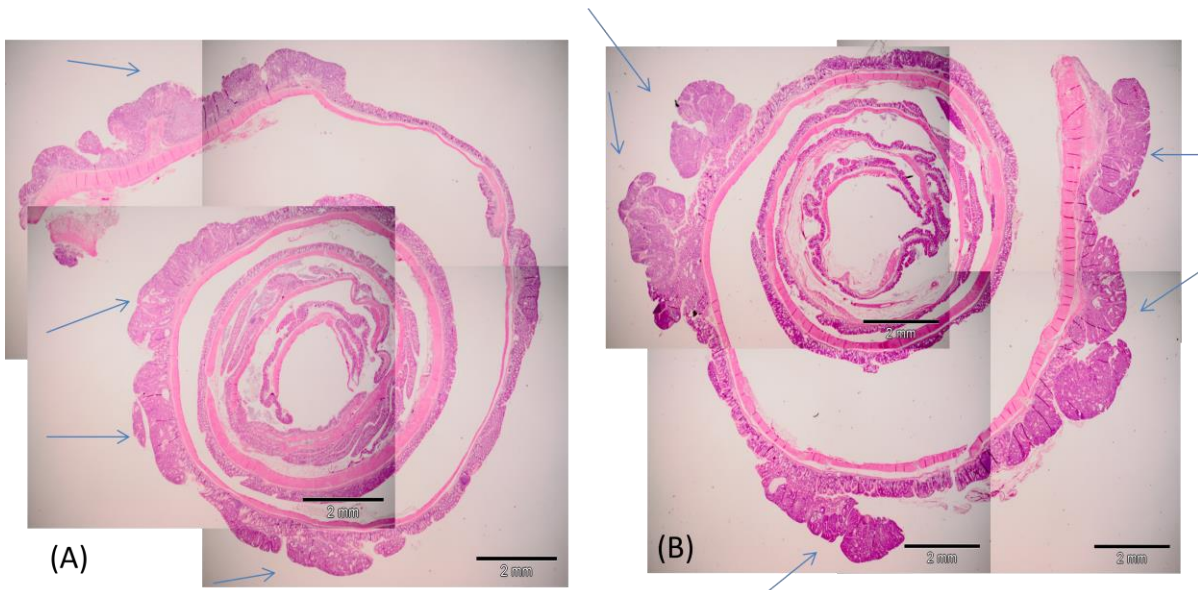


Abb. 30: Zwei illustrative Beispiele der Krebsentwicklung auf der Basis von Schnitten der Kolonrollen in Hämatoxylin-Eosin-Färbung im Rahmen der Versuchsreihe AOM-DSS-1 nach 103 Tagen für
 (A) Wildtypen (C57BL/6N): Tumore im rektalen und mittleren Bereich des Kolons
 (B) transgene sgp130Fc-Mäuse: erhebliche Tumormasse kolo-rektalen Bereich und drei große Tumore im mittleren Bereich des Kolons

Eine abschließende Beurteilung der Tumorentwicklung zeigt nun der Vergleich von Tumoranzahl, Tumorload und Tumorgröße auf der Basis der Ausmessung der Tumore in den Kolonrollen (Abb. 35). Zwar zeigt sich bei allen drei Messgrößen ein leicht höherer Durchschnitt für die transgenen sgp130Fc-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen, dieser Unterschied ist jedoch aufgrund der deutlichen Streuung in den jeweiligen Messwerten bei allen drei Messparametern statistisch nicht signifikant.

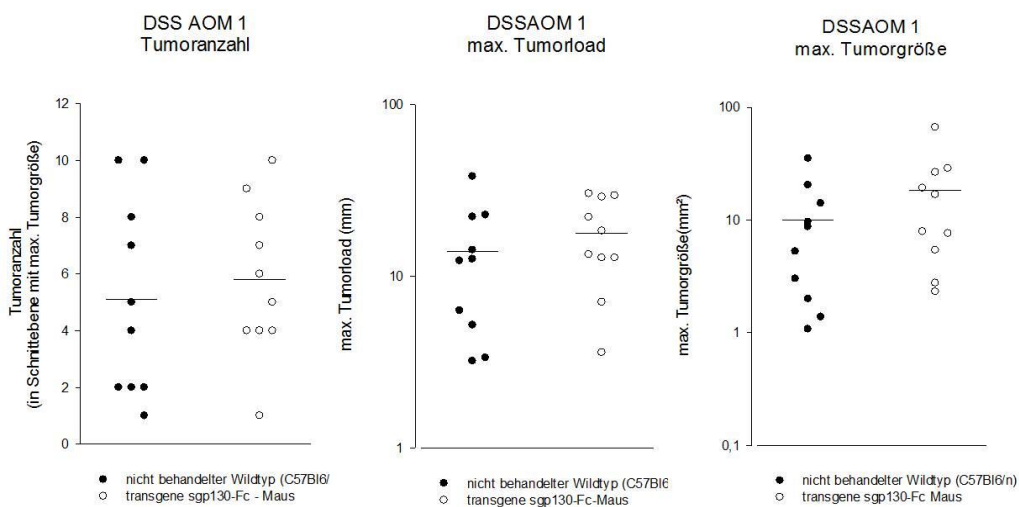


Abb. 31: Histologischer Vergleich der Karzinogenese zwischen unbehandeltem Wildtyp und transgenem sgp130Fc-Typ nach 103 Tagen im Rahmen der Versuchsreihe AOM-DSS-1 hinsichtlich Tumoranzahl, Tumorload und Tumorgröße.

Daher kann festgehalten werden, dass die transgenen sgp130Fc-Mäuse zwar zumindest in einer klinischen Betrachtung eine höhere Anfälligkeit für die DSS-Colitis im Vergleich zu den Wildtypen aufzeigen, diese Anfälligkeit sich jedoch nicht in einer statistisch signifikant stärkeren Entwicklung von Adenomen im Rahmen des DSS-AOM-Modells niederschlägt. Insoweit spiegelt dieses Resultat den protektiven Effekt von sgp130Fc auf die Wirkung des AOM als Karzinogen wieder. Die Tumorentwicklung bei den transgenen Tieren bestätigte sich bei makroskopischer Betrachtung der entnommen Organe auch in der zweiten und dritten Versuchsreihe.²⁶

3.2.4. Zusammenfassung

Die Interpretation der vorliegenden Daten muss unter dem bereits ausgeführten Vorbehalt bzgl. der verwendeten AOM-Charge und potentieller Unterschiede im Mikrobiom der Versuchstiere erfolgen.

Unter diesen Vorbehalten kann festgestellt werden, dass die transgenen sgp130Fc-Versuchstiere im DSS-AOM-Modell eine konstante signifikante Tumorentwicklung aufzeigten.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Tumorentwicklung zwischen den transgenen sgp130Fc-Mäusen und den Wildtypen (C57BL/6N) histologisch gemessen werden.

Becker konnte im DSS-AOM-Modell durch intraperitoneale Gabe von sgp130Fc als selektive Blockade des IL6-Transsignalings das intestinale Tumorwachstum stoppen (Becker, Fantini et al. 2004). Dieser Ursache-Wirkungszusammenhang eines durch erhöhte sgp130Fc-Serumkonzentration verringerten Tumorwachstums ist bei transgenen sgp130Fc-Mäusen nicht zu beobachten.

Dies könnte ein weiterer Hinweis auf ein verändertes Immunsystem bei transgenen sgp130Fc-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen sein, welches zu unterschiedlicher Entwicklung des Tumorwachstums bei Erhöhung der sgp130Fc-Serumkonzentration, je nach Art der Vorgehensweise (transgen versus intraperitonealer Injektion), führt.

²⁶ Hier jedoch zeigten die überlebenden Wildtypen die makroskopisch tendenziell höhere Tumorentwicklung. Da jedoch in diesen Versuchsreihen mehr als 50% bzw. 67% aller Wildtypen trotz teilweiser deutlicher Verkürzung der DSS-Perioden gegenüber dem Standard-Versuchsprotokoll starben, was bezogen auf den Typ C57BL/6N im DSS-AOM-Modell als sehr untypisch angesehen werden muss, und diese Tiere als Bezug von Charles-River wiederum eine andere Herkunft als die transgenen sgp130Fc-Mäuse aus eigener Zucht aufwiesen, wurde auf eine aufwendige histologische Analyse dieser Ergebnisse verzichtet.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt einen signifikanten Unterschied in der Wirkung von sgp130Fc bei intraperitonealer Injektion im Vergleich zu einer transgenen Erhöhung der sgp130Fc-Konzentration im Rahmen des DSS-Colitis-Modells. Ein im Entzündungsverlauf signifikant stärkerer Gewichtsverlust, Unterschiede in der Rekrutierung von Makrophagen, im relativen Gewicht mesenterialer Lymphknoten sowie in der Entwicklung der sgp130Fc-Konzentration in der Lamina propria des Kolons, deuten auf eine veränderte Immunantwort bei den transgenen Tieren durch die dauerhafte Blockade des Transsignalings hin, die auch schon in einem bakteriellen Entzündungsmodell in anderer Form beobachtet wurde (Hoge, Yan et al. 2013).

Die intraperitoneale Injektion von sgp130Fc führte in der DSS-Colitis je nach Dosierung und Injektionsschema zu einer unterschiedlich starken, aber immer signifikanten Reduktion der Entzündungsreaktion. Dieses Ergebnis bestätigt die Bedeutung der Dosierung bei intraperitonealer Injektion von sgp130Fc, auf die auch schon in anderem Zusammenhang hingewiesen wurde (Waetzig and Rose-John 2012).

Die peritoneale Gabe von sgp130Fc im Rahmen des DSS-AOM-Modells führt nachweislich zu einer deutlichen Reduktion bzw. Vermeidung der Tumorentwicklung (Becker, Fantini et al. 2004; Matsumoto, Hara et al. 2010; Chalaris, Garbers et al. 2011). Für transgene sgp130Fc-Mäuse zeigte sich, im Vergleich mit C57BL/6N Wildtypen, kein signifikanter Unterschied in der Tumorentwicklung. Auch dies weist auf eine veränderte Immunantwort bei transgenen sgp130Fc-Mäusen hin.

4.1 Einschränkungen des Aussagegehalts vorliegender Ergebnisse

Die Vorgehensweise in dieser Arbeit führt zu einer Reihe von Einschränkungen hinsichtlich der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse:

- Die Herkunft der verwendeten Mäuse war in einigen Versuchsreihen (DSS-1, -2 sowie DSS-AOM-2, -3) mit einer Mischung aus eigener Zucht und Charles-River als Bezugsquelle nicht identisch, was gerade einen Einfluss auf die jeweilige Präsenz z.B. von Th17-Zellen in der Lamina propria haben könnte. So sind in der Literatur Fälle beschrieben, wo bei externem Bezug z.B. Wildtyp-B6-Mäuse von Taconic Farms entsprechende Th17-Zellen in der Lamina propria aufwiesen, die bei gleichem Wildtyp vom Jackson Laboratory fehlten (Ivanov, Frutos Rde et al. 2008). Der hier verwendete Subtyp C57BL/6N ist allerdings ein hervorragend standardisierter Maustyp, für den in den jüngsten Gensequenzierungen keine Unterschiede vergleichbarer Art nachgewiesen werden konnten (Mekada, Abe et al. 2009).
- Auf die Bedeutung von Genmutationen bzgl. NOD2 als Risikofaktor der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist bereits oben eingegangen worden. NOD2(-/-) Mäuse zeigen auch eine deutlich erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer DSS-induzierten Colitis (Couturier-Maillard, Secher et al. 2013). Der hier dahinter stehende Wirkungszusammenhang weist jedoch auf einen Kausalbereich der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hin, welcher in der vorliegenden Arbeit in seiner

Einflussnahme auf die Versuchsergebnisse schwer abzuschätzen ist: Das Mikrobiom des Darms. Die NOD2 (-/-) Mäuse wiesen ein verändertes Mikrobiom auf und ein Transfer dieses Mikrobioms auf Wildtyp-Mäuse führte zu einer analogen Anfälligkeit gegenüber der DSS-Colitis (Couturier-Maillard, Secher et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit verbleibt die Möglichkeit einer unbeabsichtigten Einflussnahme auf das Mikrobiom durch die genetische Veränderung bei den transgenen Tieren. Folglich sind alle Ergebnisse dieser Testreihen immer unter diesem Vorbehalt zu betrachten. In den Vorversuchen DSS-1 und DSS-2 sowie in den durchgeführten Versuchsreihen DSS-AOM-2 und DSS-AOM-3 wurden C57BL/6N Mäuse von Charles-River mit teilweise nur maximal 2 Wochen Adaptionszeit im Institutstierstall vor Versuchsbeginn eingesetzt. Hier ist die Möglichkeit eines unterschiedlichen Mikrobioms durch unterschiedliche Zuchtbedingungen und weitgehend unterschiedliche Nahrung im Vergleich zu den transgenen sgp130Fc Mäusen und die damit verbundene Einschränkung hinsichtlich der Interpretierbarkeit der Resultate größer. Gerade die unterschiedlichen Resultate bei den jeweils verwendeten Wildtypen in den Krebsversuchsreihen bei vergleichbarem Versuchsergebnis für die transgenen Tiere legen den Verdacht nahe, dass dem Mikrobiom und der damit verbundenen Tierhaltung und Ernährung eine erhebliche Bedeutung für die Interpretationsmöglichkeit von DSS-Colitis- und DSS-AOM-Krebsmodellen zukommt.

- Die Ergebnisse beziehen sich zudem ausschließlich auf das DSS-Colitis-Modell, welches nur eines von derzeit über 60 experimentellen Modellen zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist (Mizoguchi 2012). Die Stärke dieses Modells liegt sicherlich in der Tatsache, dass es viele bedeutende Aspekte der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen widerspiegelt. Allerdings ist die Ableitung von Aussagen über die Kausalzusammenhänge in diesem Modell nicht immer möglich. Während jüngere Arbeiten beispielsweise die Rolle von IL-17 im Zusammenspiel von CSF und MCP-1 im Entzündungsablauf der DSS-Colitis betonen (Ito, Kita et al. 2008), konnte Dieleman frühzeitig zeigen, dass das DSS-Modell auch mit SCID (severe combined immunodeficiency) Mäusen, also Mäusen, denen B- sowie T-Zellen fehlen, ebenfalls funktioniert (Dieleman, Ridwan et al. 1994). Sommer konnte zu dem zeigen, dass insbesondere IL-6 auch außerhalb des klassischen Signalings und Transsignalings via IL-6/IL-6R einen Einfluss auf den Verlauf der DSS-Colitis hat (Sommer, Engelowski et al. 2014).²⁷

4.2 Die besondere Bedeutung des Mikrobioms des Darms in der CED

Die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota wird maßgeblich durch den genetischen Hintergrund, die Haltung und die Ernährung der jeweiligen Tiere mitbestimmt. Die folgenden Ausführungen sollen illustrieren, welchen Einschränkungen kausale Aussagen über Wirkungszusammenhänge innerhalb einer Entzündung, speziell der DSS-Colitis, unterliegen, wenn die Vergleichsgruppen nicht aus der gleichen Zucht entstammen und vor Versuchsbeginn keine explizite Analyse des Mikrobioms der verwendeten Tiere erfolgt:

²⁷ Die alleinige Behandlung von Mäusen mit einem monoklonalen Antikörper gegen IL-6 (IL-6 mAbs) führte zu einem leicht verbesserten Verlauf der DSS-Colitis in der Regenerationsphase. Ein, durch gentechnische Veränderung erzeugtes, weitgehendes Fehlen von IL-6R zeigte jedoch keinen Einfluss auf den Verlauf der Regeneration in der DSS-Colitis (Sommer, Engelowski et al. 2014).

In der mutualistischen Beziehung zwischen Wirt und Mikrobiota des Darms ist das Mikrobiom physiologisch neben der Verdauung und Fermentierung von Carbohydraten, der Produktion von Vitaminen, der Entwicklung des darmassoziierten lymphatischen Gewebes (GALT), sowohl an der Ausprägung von darmspezifischen Immunantworten als auch an der Vermeidung der Ansiedlung von Pathogenen beteiligt (Kamada and Nunez 2013; Kamada, Seo et al. 2013).

Der besondere Einfluss der Mikrobiota des Darms beispielsweise bzgl. der Th17-Zellen wird dadurch deutlich, dass sich die Präsenz der intestinalen Th17-Zellen bei keimfreien Mäusen bzw. bei Behandlung der Mäuse mit Antibiotika deutlich reduziert (Ivanov, Frutos Rde et al. 2008). Ein bekannter Vertreter für die Forcierung von Th17-Zellen im Darm sind die mit den Clostridien verwandten SFBs (segmented filamentous bacteria), deren Anhaftung an das Darmepithel des Wirts zu einer Steigerung der Produktion des Proteins SAA (serum amyloid A) führt, welches wiederum die Produktion von IL-6 und IL-23 durch dendritische Zellen in der Lamina propria und dadurch eine verstärkte Differenzierung zu Th17-Zellen nach sich zieht (Ivanov, Atarashi et al. 2009; Peloquin and Nguyen 2013). Spezielle Vertreter aus der Gruppe der Clostridien selber (*Clostridium septum* und *coccoides*) sind hingegen entscheidend für die Erhaltung der Homöostase der Mukosa bei der chronisch entzündlichen Darmerkrankung.²⁸

Durch Einsatz der sogenannten Altered-Schaedler-Flora (ASF), einer Bakterienbesiedlung, bestehend aus 8 verschiedenen bakteriellen Spezies, welche sich alle durch eine besondere Dominanz und Persistenz in der normalen Mikroflora im Darm von Mäusen auszeichnen, konnte eine protektive Wirkung bei Wildtypen gegenüber DSS-Colitis, analog über die Induktion von regulatorischen T-Zellen, erzielt werden (Geuking, Cahenzli et al. 2011).²⁹ Insgesamt sind derzeit allein aus der Gruppe der kommensalen Bakterien mindestens 5 protektive und 14 induzierende Vertreter bzgl. der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bekannt (Kamada, Seo et al. 2013).

Analog zur chronisch entzündlichen Darmerkrankung spielt auch bei dem Colitis assoziierten Darmkrebs das intestinale Mikrobiom eine entscheidende Rolle, da es sowohl qualitativ wie quantitativ die Krebsentwicklung wesentlich beeinflusst (Gueimonde, Ouwehand et al. 2007; Uronis, Muhlbauer et al. 2009; Arthur, Perez-Chanona et al. 2012). Je nach Art der Störung der Homöostase der intestinalen Mikroflora und der hier vorherrschenden Bakterienart kommt es zu unterschiedlicher Förderung der entzündungsassoziierten Darmkarzinogenese. *Barteriodes fragilis* fördert die Darmkarzinogenese beispielsweise durch forcierte Schleimhautschäden und Colitis mit folgender STAT3-Aktivierung und IL-17-Produktion (Wu, Rhee et al. 2009).

²⁸ So führte die Kolonisierung von 46 Erregerstämmen von Clostridien bei Wildtypen zu einer Induktion von IL-10 produzierenden T-Reg Zellen in der Lamina propria und damit unter anderem auch zu einem Schutz gegenüber einer DSS-Colitis. Diese Wirkung der Clostridien-Stämme war um so stärker, je früher die entsprechenden Wildtypen mit ihnen konfrontiert waren (maximale Wirkung bei Lebensalter von 2 Wochen) (Atarashi, Tanoue et al. 2011).

²⁹ So erstaunt es nicht, dass DSS-Colitis durch eine antibiotische Behandlung (Metronidazol, Vancomycin und Imipenem) reduziert oder gar vermieden werden kann, aber auch umgekehrt eine probiotische Behandlung die DSS-Colitis forcieren kann. Umgekehrt gilt aber auch, dass sich die DSS-Colitis auch bei keimfreien Mäusen in mindestens gleichem Umfang wie bei vergleichbaren Wildtypen zeigt (Elson, Cong et al. 2005).

4.3 Selektive IL-6-Blockade zur Reduktion von Infektionen im Rahmen der CED-Therapie

Alle in der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzten Immunsuppressiva führen zu einer deutlichen Erhöhung des Infektionsrisikos, welches sich bei einer Kombinationstherapie noch erheblich verstärkt (Toruner, Loftus et al. 2008). Eine deutliche Erhöhung des Infektionsrisikos ist, wie in der Einleitung bereits erläutert, auch bei einer globalen Blockade von IL-6 im Rahmen einer Behandlung mit Tocilizumab zu beobachten (Schiff, Kremer et al. 2011).

Für eine bakterielle Infektion mit *Listeria monocytogenes* konnte gezeigt werden, dass die Kontrolle dieser Infektion maßgeblich durch klassisches Signaling von IL-6 beeinflusst wird. So führte eine globale Blockade von IL-6 zu einer Intensivierung der Infektion, während eine selektive Blockade des Transsignalings mittels injiziertem sgp130Fc keinen Einfluss auf das Infektionsgeschehen zeigte. Die Ergebnis bestätigte sich auch im Vergleich von sogenannten IL-6-knock-out-Mäusen, die nicht über eine Expression von IL-6 verfügen, zu transgenen sgp130Fc-Mäusen, in denen lediglich das Transsignaling durch eine dauerhaft erhöhte Serumkonzentration von sgp130Fc blockiert ist: Die IL-6-knock-out-Mäuse zeigten einen schwereren Infektionsverlauf im Vergleich zu den transgenen sgp130Fc-Mäusen (Hoge, Yan et al. 2013).

Allerdings konnten auch im Rahmen einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* Unterschiede in der Immunreaktion bei Injektion von sgp130Fc im Vergleich zu einer dauerhaft erhöhten Serumkonzentration von sgp130Fc bei transgenen sgp130Fc-Mäusen beobachtet werden. Eine dauerhafte Blockade des Transsignalings bei den transgenen sgp130Fc-Mäusen führte im Entzündungsverlauf zu einer Verringerung der Monozyten und zu einer verbesserten Infektionskontrolle im Vergleich zu den mit sgp130Fc injizierten Mäusen. Als Erklärung für diesen Unterschied wird eine durch die dauerhafte Blockade des Transsignalings bedingte Änderung der Entwicklung und der zellulären Zusammensetzung des Immunsystems vermutet (Hoge, Yan et al. 2013).

Bei dem hier angewendeten Entzündungsmodell der DSS-Colitis handelt es sich um eine chemische Induktion der Erkrankung. Interaktionen, wie sie zwischen pathogenen und kommensalen Bakterien im Rahmen einer Darmentzündung stattfinden und die im obigen Modell der Infektion mit *Listeria monocytogenes* eine wichtige Rolle spielen, sind hier nicht bzw. nur begrenzt darstellbar.

Die Ergebnisse einer durch bakterielle Infektion bzw. chemisch ausgelösten Darmentzündung sind daher nicht zwingend vergleichbar. Daher widersprechen die Ergebnisse von Hoge et. al. nicht den hier vorgestellten Untersuchungsergebnissen, in denen eine dauerhafte Blockade des Transsignalings bei den transgenen sgp130Fc-Mäusen klinisch zu einem verstärkten Gewichtsverlust führte, während die Injektion von sgp130Fc den Gewichtsverlust im Rahmen der DSS-Colitis signifikant reduzierte.

Ein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Ulzeration im Darm war auch in der DSS-Colitis zwischen diesen Maustypen nicht zu beobachten. Es ergaben sich aber auch in der vorliegenden Arbeit Unterschiede in den Häufigkeiten der Makrophagen im Entzündungsverlauf: Während die Injektion von sgp130Fc auch in der DSS-Colitis zu einer Verringerung der Makrophagen analog den Ergebnissen von Hoge führte, zeigte sich bei den transgenen sgp130Fc-Mäusen nur eine im Vergleich zu den Wildtypen verzögerte Rekrutierung der Makrophagen.

Grundsätzlich kann man zwei Gruppen von Makrophagen unterscheiden:

- Klassisch aktivierte Makrophagen (M1-Makrophagen) vermitteln die Abwehr von Bakterien, Viren und Protozoen. Die Rekrutierung dieser Makrophagen erfolgt, wie oben beschrieben, mit Hilfe des Transsignalings von IL-6 (Rabe, Chalaris et al. 2008) und ist folglich bei transgenen sgp130Fc-Mäusen blockiert.
- Alternativ aktivierte Makrophagen (M2-Makrophagen) haben eine antiinflammatorische Funktion und regulieren die Wundheilung. Die Proliferation dieser M2-Makrophagen erfolgt IL-4 abhängig auf lokalem Weg (Jenkins, Ruckerl et al. 2011) und wird durch IL-6 induziert (Mauer, Chaurasia et al. 2014)³⁰.

Ausgehend von einer dauerhaften Blockade des Transsignalings bei den transgenen sgp130Fc-Mäusen liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem verzögerten Anstieg der Makrophagen im Fall der transgenen sgp130Fc-Mäuse um M2-Makrophagen handelt. Diese antiinflammatorischen M2-Makrophagen führen nicht zu einer Forcierung des Entzündungsgeschehens und damit auch nicht zu einer Vergrößerung von histologisch nachweisbaren Ulzerationen im Darm.

Allerdings haben M2-Makrophagen einen positiven Einfluss auf das Tumorwachstum (Murray and Wynn 2011). So könnte erklärbar sein, warum die transgenen sgp130Fc-Mäuse innerhalb des AOM-DSS-Modells nicht, wie bei peritonealer Injektion von sgp130Fc, eine reduzierte Karzinogenese im Vergleich zu den Wildtypen aufzeigten.

Ausgehend von der proinflammatorischen Wirkung des Transsignalings liegt in jedem Fall eine große Chance in der selektiven Blockade dieses Signalwegs durch Injektion von sgp130Fc, die Rate von schweren Infekten im Rahmen einer Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen deutlich zu reduzieren.

4.4 Metabolische Auswirkungen bei Blockade von TNF α und IL-6

Wie für andere Krankheitsbilder (z.B. Psoriasis) beschrieben, besteht ein klarer Zusammenhang zwischen Nichtansprechen der TNF α -Antikörper-Therapie und hohem Body-Maß-Index zu Beginn der Therapie (Di Lernia, Ricci et al. 2014). In diesem, für die TNF α -Antikörper-Therapie kritischen Bereich von übergewichtigen Patienten, könnte sich eine Therapie auf Basis einer selektiven IL-6 Blockade mit sgp130Fc als überlegener Ansatz etablieren: Sie vermeidet die negativen metabolischen Nebenwirkungen einer globalen Blockade von IL-6R in Form einer erheblichen Gewichtszunahme (Nishimoto, Kanakura et al. 2005; Maini, Taylor et al. 2006; Smolen, Beaulieu et al. 2008; Kraakman, Allen et al. 2013), ohne die positive Wirkung des klassischen Signalings von IL-6 auf die Homöostase der Glukose- und Lipidkonzentration zu blockieren:

³⁰ IL-6 induziert hierbei die verstärkte Expression des Rezeptors von IL-4 (IL-4R) und erhöht hierüber die über IL-4 gesteuerte Aktivierung des Signalüberträgers und Transkriptionsaktivators 6 (STAT6). Dieser Signalweg über IL-4 und STAT6 ist wiederum der stärkste Auslöser für eine M2-Polarisierung von Makrophagen (Mauer, Chaurasia et al. 2014).

- sIL-6R ist ein wesentliches chemotaktisches Zytokin innerhalb eines Diabetes vom Typ 2. Die selektive Blockade des Transsignalings von IL-6 durch sgp130Fc vermeidet die Akkumulation von Makrophagen des Fettgewebes, vermeidet aber die metabolischen Nebenwirkungen z.B. einer Leberentzündung, die bei einer globalen Blockade von IL-6 in diesem Zusammenhang beobachtet werden können (Matthews, Allen et al. 2010; Kraakman, Kammoun et al. 2015).³¹
- Das von weißem Fettgewebe sezernierte IL-6 führt im Rahmen einer Entzündungsreaktion zu einer erhöhten Konzentration TNF α und M1-Makrophagen, die eine Insulinresistenz fördern (Hotamisligil, Shargill et al. 1993; Hotamisligil, Arner et al. 1995; Lumeng, Bodzin et al. 2007; Patsouris, Li et al. 2008).
- Umgekehrt fördert das intramuskulär sezernierte IL-6 die Fettsäureoxidation (Pedersen and Febbraio 2008) und erhöht über klassisches Signaling (mIL6R) in intestinalen L-Zellen und α -Zellen im Pankreas die Insulinsekretion.³² Zusätzlich bewirkt intramuskulär sezerniertes IL-6 in diesem Zusammenhang einen Anstieg von M2-Makrophagen und damit einen Anstieg der Glukosetoleranz und hat einen antiinflammatorischen Effekt im Rahmen einer Entzündungsreaktion auf Lipopolysaccharide (LPS) (Mauer, Chaurasia et al. 2014).

Gerade unter anderem bei bestehendem Diabetes Typ 2 kann daher eine durch die Globale IL-6 Blockade eine so reduzierte Insulinsekretion auf Basis einer verringerten GLP-1 Sekretion der L- und α -Zellen im Pankreas das metabolische Krankheitsgeschehen eventuell sogar mehr forcieren als lindern (Franchimont, Gangji et al. 1997; Wallenius, Wallenius et al. 2002; Ellingsgaard, Ehses et al. 2008; Ellingsgaard, Hauselmann et al. 2011; Kraakman, Allen et al. 2013). Durch selektive Blockade der proinflammatorischen Wirkung von IL-6 mittels sgp130Fc und damit gleichzeitigem Erhalt des klassischen Signalings kann dies vermieden werden.

4.5 Mögliche Perspektiven von sgp130Fc in der Behandlung von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

Wie in der Einleitung ausführlich erläutert wurde, besteht sowohl für Morbus Crohn als auch Colitis ulcerosa eine gemäß der Leitlinie abgestufte Strategie der medikamentösen Behandlung, in deren Mittelpunkt die Immunsuppression mit Kortikosteroiden sowie bei unzureichender Wirksamkeit der Einsatz weiterer Immunsuppressiva wie Azathioprin oder TNF α -Antikörpern steht. Die klinische Effektivität der Behandlung mit TNF α -Antikörpern (Infliximab, Adalimumab, Certolizumab sowie Golimumab) für die chronisch entzündliche Darmerkrankung gegenüber Placebo konnte in insgesamt 19 Studien hinreichend nachgewiesen werden (Dretzke, Edlin et al. 2011; Schreiber, Lawrance et al. 2011; Kawalec, Mikrut et al. 2013). Dies gilt sowohl für die

³¹ Eine durch sgp130Fc induzierte Reduktion der Makrophagen im Fettgewebe führte jedoch nicht zu einer Verbesserung bezüglich der Insulinresistenz (Kraakman, Kammoun et al. 2015).

³² Ursächlich hierfür ist die hohe Konzentration von membrangebundenen IL-6-Rezeptoren bei intestinalen L-Zellen und α -Zellen des Pankreas. Das klassische Signaling von IL-6 führt bei den intestinalen L-Zellen zu einer forcierten Sekretion des Inkretins (stimulation insulin release hormon) GLP-1 (Glucagon-like peptide-1). Bei den α -Zellen des Pankreas erhöht sich durch das klassische IL-6-Signaling neben dem GLP-1-Vorläufer Proglucagon auch die Konzentration des Enzyms PC1/3 relativ zum Enzym PC2. Während PC2 für die Umwandlung von Proglucagon in Glucagon verantwortlich ist, wird durch erhöhte Konzentration von PC1/3 verstärkt Proglucagon in GLP-1 umgesetzt und sezerniert. Die insgesamt erhöhte Konzentration von GLP-1 bewirkt in den β -Zellen des Pankreas eine entsprechende Insulinausschüttung (Ellingsgaard, Hauselmann et al. 2011).

Erzielung einer Remission in einer akuten Entzündung als auch für die Erhaltung der Remission. Gleiches gilt auch für die Abheilung von Fisteln bei Morbus Crohn. Der Einsatz von Infliximab im Rahmen der Behandlung von Morbus Crohn wurde auch in vier Wirtschaftlichkeitsstudien als kosteneffektiv eingestuft (Dretzke, Edlin et al. 2011), wenngleich auch diesen Wirtschaftlichkeitsrechnungen immer eine gewisse Subjektivität hinsichtlich ihrer zugrundeliegenden Annahmen bescheinigt werden muss. Insofern ist der Einsatz von TNF α -Antikörpern gemäß der Leitlinie eine etablierte Vorgehensweise in der Behandlung der chronisch entzündlichen Darmerkrankung.

Trotzdem verbleiben aber eine Reihe von Problemen in der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen:

- Ein primäres Therapieversagen zum Beispiel bei TNF α -Blockern von 10-30% und ein sekundäres Versagen im Verlauf des ersten Behandlungsjahres von 30-40% (Hanauer, Feagan et al. 2002; Colombel, Sandborn et al. 2007; Schreiber, Lawrance et al. 2011) zeigt jedoch die Notwendigkeit auf für alternative Ansätze, wie einer Hemmung der Entzündung durch Blockade von IL-6.
- Alle in der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzten Immunsuppressiva führen zu einer deutlichen Erhöhung des Infektionsrisikos, welches sich bei einer Kombinationstherapie noch erheblich verstärkt (Toruner, Loftus et al. 2008).
- Nach heutiger Leitlinie ist vor Beginn einer TNF α -Therapie das Tuberkulose-Screening, bestehend aus Tuberkulin-Test, klinischer Untersuchung und Anamnese sowie Röntgenuntersuchung, üblich. Hiermit sollen Patienten mit ruhender Tuberkulose weitestgehend vor der Behandlung ausgemustert werden. Aktuelle Fälle zeigen jedoch, dass es auch zu einer de novo Entwicklung von Tuberkulose, trotz negativem Test, unter TNF α -Therapie kommen kann (Debeuckelaere, De Munter et al. 2014). Im Unterschied zu TNF α zeigte sich im Tierversuch bei Einsatz von transgenen sgp130Fc-Mäusen jedoch keine Störung der protektiven Immunantwort nach Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* (Sodenkamp, Waetzig et al. 2012). Somit könnte sich auch unter diesem Aspekt die selektive sgp130-Therapie nicht nur für die an (ruhender) Tuberkulose erkrankten Patienten, sondern auch allgemein hinsichtlich des Risikos für eine de novo Entstehung von Tuberkulose unter Immuntherapie, als überlegen gegenüber der TNF α -Therapie erweisen.

Diese Beispiele sollten neben der oben ausgeführten Problematik von Übergewicht und Diabetes hinreichend die Potentiale eines selektiven Ansatzes einer IL-6-Blockade des Transsignalings mit sgp130Fc gegenüber einer allgemeinen Immunsuppression bzw. einer globalen IL-6-Blockade wie mit Tocilizumab gerade im Bereich der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verdeutlichen.

So bleibt es wünschenswert, dass sgp130Fc als selektive IL-6-Transsignaling-Blockade möglichst bald als potentielle Alternative zur TNF α -Therapie bzw. als Alternative zum Einsatz globaler IL-6-Blocker seine Überlegenheit auch in klinischen Studien unter Beweis stellen kann.

5 Zusammenfassung

Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, stellen mit über 320.000 Betroffenen allein in Deutschland ein erhebliches Patientenkollektiv dar. Derzeitige Behandlungsansätze, speziell Kortison, Immunsuppressiva und TNF α -Blocker, können den Krankheitsverlauf erheblich verbessern, sind jedoch aufgrund von Nebenwirkungen, Unverträglichkeiten und selektivem Therapieversagen nicht für alle Patienten wiederholt bzw. dauerhaft einsetzbar. IL-6 spielt sowohl im Entzündungsverlauf als auch in der mit der Colitis ulcerosa assoziierten Darmkarzinogenese eine zentrale Rolle und stellt somit ein geeignetes Ziel zur Behandlung dieser Krankheiten dar. Der hier verfolgte Behandlungsansatz mit sgp130Fc ist sonstigen pauschalen IL-6-Blockern überlegen, da er eine selektive Blockade des proinflammatorischen Signalweges über sIL-6R (Transsignaling) ermöglicht, während der antiinflammatorische Signalweg über mL-6R (klassisches Signaling) erhalten bleibt. Im Folgenden wurden 3 Versuchsgruppen (Mäuse mit transgen erhöhter Expression von sgp130Fc sowie C57BL/6N Wildtypen mit und ohne peritonealer Injektion von sgp130Fc) gegenübergestellt.

Der erhebliche Einfluss eines unterschiedlichen Mikrobioms der verwendeten Versuchstiere auf die hier erzielten Ergebnisse kann trotz überwiegend einheitlicher Tierhaltung und Ernährung schon aufgrund der genetischen Manipulation bei transgenen sgp130Fc-Mäusen gerade bei dem hier verwendeten Modell der DSS-Colitis nicht ausgeschlossen werden. Zudem führte die in der ersten Versuchsreihe des AOM-DSS-Modells verwendete Charge des Wirkstoffs AOM von Sigma Aldrich bei Einsatz in einem weiteren Krebsmodell im Unterschied zur hier beschriebenen Versuchsreihe zu einem nicht erklärbaren frühzeitigen Tod der Versuchstiere.

Die durchgeführten Tierversuche zur DSS-Colitis zeigen klinisch eine deutliche Reduzierung bzw. Vermeidung der Colitis bei peritonealer Gabe von sgp130Fc, während transgene Tiere mit genetisch induzierter Überexpression von sgp130Fc einen signifikant erhöhten Gewichtsverlust nach DSS-Gabe aufwiesen – histologisch zeigten sich hinsichtlich des Ausmaßes an Ulzerationen keine signifikanten Unterschiede. Nach erfolgter Entzündung ergab sich, gemessen anhand der Gewichtsentwicklung, bei den transgenen Tieren eine verzögerte Regeneration. Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten erste Hinweise auf unterschiedliche Verläufe, speziell in der Makrophagenrekrutierung im Entzündungsverlauf zwischen den betrachteten Tiergruppen. Zudem konnte, im Unterschied zu den peritoneal mit sgp130Fc injizierten Tieren, bei den transgenen Versuchstieren eine deutlich stärkere Zunahme der sgp130Fc-Konzentration in der Lamina propria des Kolons im Entzündungsverlauf beobachtet werden. Auch war das relative Gewicht der mesenterialen Lymphknoten, bezogen auf das Gesamtkörpergewicht, bei den transgenen Versuchstieren an Tag 8 nach Start der DSS-Gabe signifikant höher als bei den anderen Maustypen. Die hier beobachteten Unterschiede zwischen transgenen und injizierten Versuchstieren deuten auf eine veränderte Immunantwort bei den transgenen Tieren durch die dauerhafte Blockade des Transsignalings hin.

Zur Untersuchung der Wirkung einer permanenten Erhöhung von sgp130Fc auf die mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziierte Darmkarzinogenese wurden transgene sgp130Fc-Mäuse ihren Wildtypen (C57BL/6N) im Rahmen des DSS-AOM-Modells gegenübergestellt. Hierbei wurde durch wiederholte Gabe von DSS in Verbindung mit dem Karzinogen AOM eine Tumorgenese induziert. Die klinisch erhöhte Anfälligkeit der transgenen sgp130Fc-Maus bezüglich DSS, sowohl bezogen auf den maximalen Gewichtsverlust als auch auf die Dauer der Regeneration, hätte auch einen signifikanten Unterschied in der darauf aufbauenden, AOM-induzierten Karzinogenese nach 100 Tagen erwarten lassen. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Tumoranzahl, Tumorload und Tumormasse zwischen den Vergleichsgruppen. Dies weist einerseits auf einen hemmenden Effekt von sgp130Fc auf die AOM-induzierte Zellproliferation hin, wie er auch in der bestehenden Literatur beschrieben ist. Andererseits liegt die bei der transgenen sgp130Fc-Maus beobachtete Tumorentwicklung deutlich über den aus der Literatur bekannten Ergebnissen bei peritonealer Gabe von sgp130Fc, sodass auch dieser Unterschied auf eine veränderte Immunantwort bei den transgenen Tieren durch die dauerhafte Blockade des Transsignalings hin deutet.

Die Reduktion der Colitis im Rahmen des DSS-Modells bei peritonealer Gabe von sgp130Fc und die durch sgp130Fc induzierte Reduzierung zusätzlicher Zellproliferation aufgrund gesteigerter Entzündung im DSS-AOM-Modell bestätigt das Potential von sgp130Fc für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

Das aufgrund des selektiven Ansatzes potentiell günstigere Nebenwirkungsprofil von sgp130Fc, insbesondere hinsichtlich schwerer Infektionen und geringerer metabolischer Nebenwirkungen, kann die Attraktivität dieses Behandlungsansatzes, vor allem für spezielle Patientengruppen wie Diabetiker, zusätzlich steigern.

Anhang

Prävalenz, Inzidenz und wirtschaftliche Dimension der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

CDAI – Crohn Disease-Activity Index

Bestehende Therapien der chronisch entzündlichen Darmerkrankung

 Therapieempfehlung für Morbus Crohn im Überblick

 Therapieempfehlung für Colitis ulcerosa im Überblick

Übergreifende Problematik der aktuellen medikamentösen Therapie

Beispiele und Problematik des Histologie-Scores von Rachmilewitz

CAI – Disease-Activity-Index nach Sigmund

Kolonentnahmen im Rahmen der Versuchsreihen DSS-AOM-2 und DSS-AOM-3

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Liste wesentlicher verwendeter Materialien und Geräte :

Abkürzungsverzeichnis

Literaturverzeichnis

Danksagung

Lebenslauf

Prävalenz, Inzidenz und wirtschaftliche Dimension der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Ausgehend von groben Schätzwerten und unter dem Vorbehalt einer großen Dunkelziffer für milde Verläufe liegt die Inzidenz für Morbus Crohn in Mitteleuropa bei 5,2 bis 8,6 pro 100.000 Einwohner (Shivananda, Lennard-Jones et al. 1996; Vind, Riis et al. 2006), wobei Deutschland hier im Vergleich mit 5,2 den niedrigsten Wert aufweist (Timmer, Breuer-Katschinski et al. 1999). Für die Colitis ulcerosa wird eine Inzidenz in Deutschland von 3,0 bis 3,9 pro 100.000 Einwohner geschätzt (Timmer and Goebell 1999; Ott, Obermeier et al. 2008). Ausgehend von einer häufig frühen Erstmanifestation der Erkrankungen und ihrem chronischen Verlauf korrespondieren diese Inzidenzen mit einer Prävalenz von 160 bis 250 pro 100.000 Einwohner in der westlichen Welt (Loftus, Delgado et al. 2008; Lowe, Roy et al. 2009). In Deutschland geht man derzeit von 320.000 Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung aus, je 50% davon mit Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa (Hoffmann, Preiss et al. 2008).

Auch wenn die jeweiligen Kostenschätzungen für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa teilweise voneinander abweichen, liegen aktuelle Schätzungen für direkte, jährliche medizinische Ausgaben bei 2.582€ für Morbus Crohn- und 1.837€ für Colitis ulcerosa-Patienten, wovon wiederum der Großteil auf Arzneimittelausgaben entfällt. Einen großen Zuwachs verzeichnen hierbei Biologika, also gentechnisch hergestellte Proteine, und hierbei insbesondere Hemmstoffe des Tumornekrosefaktors (TNF α), der an der Regulierung der Zellaktivität des Immunsystems mitwirkt. So entfallen hierauf bei Morbus Crohn ca. 58% bzw. bei Colitis ulcerosa 30% der direkten medizinischen Gesamtkosten, wenngleich nur 8,2% bzw. 2,5% aller Morbus Crohn- bzw. Colitis ulcerosa-Patienten einen TNF α -Blocker einsetzen (Prenzler, Mittendorf et al. 2009; Prenzler, Bokemeyer et al. 2010; Prenzler, Bokemeyer et al. 2011). Kosten für chirurgische Eingriffe und stationäre Behandlung geraten zunehmend in den Hintergrund (Rosch, Leidl et al. 2002; Stark, König et al. 2006; Prenzler 2010; van der Valk, Mangan et al. 2014). Ausgehend von Schätzungen, dass neben den direkten medizinischen Kosten auch indirekte Kosten in doppeltem Umfang durch Arbeitsausfälle, Rente etc. hinzukommen, ergeben allein in Deutschland Hochrechnungen der jährlichen Kosten für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa einen Aufwand in Milliardenhöhe (Prenzler, Bokemeyer et al. 2011).

CDAI – Crohn Disease-Activity Index

Der CDAI berücksichtigt 8 Faktoren, um die verschiedenen Symptome der Krankheit in ihrem Ausmaß quantitativ zu bewerten.

Klinische Faktoren	Wertungsfaktor
Anzahl weicher Stuhlgänge in den letzten 7 Tagen	x 2
Bauchschmerzen (0 = keine, 3 = starke Schmerzen)	x 5
Allgemeinbefinden in den letzten 7 Tagen (gut = 0, unerträglich = 4)	x 7
Symptomatische Behandlung von Durchfall	x 30
Anwesenheit von Komplikationen: (jeweils 1 Punkt)	
Arthritis, Iritis, Uveitis, Erythema nodosum, Stomatitis aphthosa, Pyoderma gangränosum, Analfissur, -fisteln, -abszess	x 20
Resistenz im Abdomen (0 = nein, 2 = fraglich, 5 = sicher)	x 10
Abweichung des Hämatokrit (in%) (Frauen: 42%) (Männer: 47%)	x 6
Abweichung vom Standardgewicht (in %)	x 1

Liegt nun der CDAI als Gesamtsumme unter 150, wird von einer Remission gesprochen. Liegt der CDAI über 220, spricht man von einem moderaten Krankheitsschub bzw. bei Werten über 450 von einem schweren Krankheitsschub (Best, Becktel et al. 1976).

Bestehende medikamentöse Therapien der chronisch entzündlichen Darmerkrankung

Die derzeitige Therapieempfehlung für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Deutschland ist niedergelegt in den S3-Leitlinien für Morbus Crohn von 2014 (gültig bis 2018) bzw. Colitis ulcerosa von 2011 (gültig bis 2016). In diesen Leitlinien wird jeweils eine Stufentherapie zur Behandlung der chronisch entzündlichen Darmerkrankung empfohlen, in der, abgestimmt nach dem Schweregrad der Entzündung und ihrer Ausbreitung bzw. Lokalisation, unterschiedliche Pharmazeutika zum Einsatz kommen. Neben diesen auf Immunsuppression und Entzündungsreduktion ausgerichteten Pharmakotherapien steht zusätzlich die nutritive Therapie, die eine Vermeidung immunstimulierender Exposition zum Ziel hat. Als weitere Therapiestufe werden neben der chirurgischen Therapie der Einsatz von TNF α -Inhibitoren zur Blockade der intestinalen bzw. systemischen Immunantwort empfohlen. Erstes Ziel ist immer die Remissionseinleitung und deren Erhaltung. Daneben spielen aber auch die Erhöhung der Lebensqualität, die Vermeidung oder zumindest Abschwächung von extraintestinalen Manifestationen und Diarrhöe, eine Erhöhung der Leistungsfähigkeit sowie eine Reduktion der Häufigkeit von Krankenhausaufenthalten eine wichtige Rolle.

Medikamentöse Therapieempfehlung für Morbus Crohn im Überblick

Die letzte gültige S3-Leitlinie von 2014 differenziert hinsichtlich der Therapieempfehlung nach Lokalisation und Schweregrad der Entzündung, ausgehend vom Crohn Disease Activity Index (CDAI) nach Best, in einen schwachen, mäßigen und hohen Entzündungsgrad, ohne jedoch jeweils eine exakte Definition in Form von Indexbereichen zu nennen. Der Crohn Disease Activity Index berücksichtigt dabei 8 verschiedene klinische Faktoren, die mit unterschiedlichen Wertungsfaktoren multipliziert und anschließend addiert werden.

Schwerpunkt der Behandlung ist, ausgehend von einer überschießenden Immunreaktion, die Suppression des Immunsystems mit Glukokortikoiden, die, indem sie die Zellmembran durchdringen, intrazellulär mit speziellen Rezeptoren einen Komplex bilden und im Zellkern die Synthese zahlreicher Proteine beeinflussen, die den Entzündungsprozess unterhalten: Bei einer Entzündung bewirken Glukokortikoide u.a. eine Hemmung der Gewebsinfiltration von neutrophilen Granulozyten durch eine Störung ihrer Adhäsion an die Gefäßwand. Zusätzlich vermindern Glukokortikoide die Lymphozytenzahl und die Interleukinproduktion und bewirken eine deutliche Abnahme der Einwanderung von Makrophagen und der Bildung von Zytokinen. Ausgehend vom Ileozökalbefall wird bei schwacher Entzündung die Gabe des Glukokortikoids Budesonid empfohlen, womit in bis zu 60% der Fälle eine Remission in 8-10 Wochen erreicht werden kann. Bei mäßiger Entzündung ist neben Budesonid auch die systemische Glukokortikoidgabe angezeigt, die bei 1 mg pro kg Körpergewicht (kg/KG) Kortison pro Tag eine Remission in 92% der Fälle in 6 Wochen ermöglicht. Zusätzlich wird auch in beiden Fällen eine enterale Ernährungstherapie als Therapiealternative empfohlen. Bleibt auch bei hoher Entzündungsaktivität die systemische Glukokortikoidgabe die erste Wahl, so wird jedoch bei Unwirksamkeit bzw. Kontraindikationen für Kortison der Einsatz von Immunsuppressiva, speziell Azathioprin, bzw. 6-Mercaptopurin bzw. als möglicher Ersatz auch Methotrexat empfohlen. Bei Kindern bleibt aufgrund der erheblichen Nebenwirkungen die Ernährungstherapie die erste Wahl. Sollte auch mit Hilfe der Immunsuppressiva keine Remission möglich sein, kommen nach Abklärung einer möglichen chirurgischen

Behandlungsstrategie die TNF α -Blocker (Infliximab, Adalimumab, Certolizumab sowie Golimumab) zum Einsatz, die durch Bindung an membrangebundenes wie gelöstes TNF α die Freisetzung von proinflammatorischen Interleukinen und die Einwanderung von Leukozyten in das Gewebe hemmen. Bei Crohn-Colitis mit leichter bis mäßiger Entzündungsaktivität wird eine Behandlung mit Sulfasalazin oder systemisch wirkenden Glukokortikoiden vorgeschlagen, bei hoher Aktivität eine analoge Therapie wie bei Ileozökalbefall empfohlen. Mit dem monoklonalen Antikörper Vedolizumab, einem selektiven Integrin-Inhibitor, ist seit März 2014 ein weiterer Wirkstoff für die Behandlung von Morbus Crohn zugelassen. Für Vedolizumab wird ein geringer Grad an Nebenwirkungen postuliert, da das hier blockierte Adhäsionsmolekül, welches die Einwanderung von Lymphozyten ins Gewebe ermöglicht, vorwiegend im Darm vorkommt. In welchem Umfang sich Vedolizumab bei therapierefraktärem Verlauf von Morbus Crohn bewährt, bleibt abzuwarten (Sands, Feagan et al. 2014).

Medikamentöse Therapieempfehlung für Colitis ulcerosa im Überblick

Auch bei der Colitis ulcerosa geht die S3-Leitlinie von 2011 (Dignass, Preiss et al. 2011) von einer nach Lokalisation und Schweregrad der Entzündung differenzierten Stufentherapie aus. Da sich hier im Gegensatz zu Morbus Crohn die Entzündung kontinuierlich vom Rektum aus entwickelt, stehen lokale Behandlungsstrategien am Entzündungsbeginn im Vordergrund. So wird beispielsweise bei einer leichten bis mäßigen Proktitis 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) mit einer Dosierung von >500 mg pro Tag als Suppositorium empfohlen, alternativ können Mesalazinschäume bzw. -einläufe verabreicht werden. 5-ASA wirkt als Radikalfänger, in dem es unter anderem die Wirkung des Hitzeschockproteins Hsp72 erhöht. Ein zusätzlicher antiinflammatorischer Effekt entsteht durch die Hemmung der Wirkung von IL-1, IL-2 TNF α und NF- κ B sowie durch die Reduktion der Leukotriensynthese. Bei ungenügender Wirksamkeit können Kombinationen von Mesalazineinläufen mit topischen Steroiden bzw. oraler 5-ASA-Gabe angesetzt werden. Erst bei schwererem bzw. refraktärem Verlauf (dauerhaft häufigere blutige Stuhlgänge) kommt eine systemische Steroidtherapie mit 0,5 mg/kg KG pro Tag zum Einsatz. Ist diese unwirksam oder kontraindiziert, bleibt schließlich nur noch neben der chirurgischen Therapie die Möglichkeit der Anwendung von Calcineurin-Inhibitoren wie Ciclosporin und Tacrolimus, deren Wirkungsweise auf der Hemmung von Transkription und Freisetzung von Zytokinen (IL-2, TNF α , INF γ etc.) in T-Zellen beruht. Die Behandlung der schweren Colitis ulcerosa erfolgt nach Abwägung der chirurgischen Alternativen unter stationären Bedingungen als intravenöse Steroidtherapie bzw. bei Intoleranz respektive Kontraindikation mit Ciclosporin, Infliximab oder Tacrolimus. Bei neudiagnostizierter Colitis ulcerosa konnte bei 50% der Patienten durch entsprechende Steroidgabe eine komplette Remission nach 30 Tagen erreicht werden (Ho, Chiam et al. 2006). Alternativ zu den Calcineurininhibitoren sind auch hier wieder die TNF α -Blocker (Infliximab, Adalimumab sowie Golimumab) zur Behandlung der Colitis ulcerosa zugelassen und auch hier kann seit 2014 bei therapierefraktärem Verlauf auf Vedolizumab zurückgegriffen werden.

Übergreifende Problematik der aktuellen medikamentösen Therapie

Die oben skizzierten Empfehlungen der Leitlinien für eine medikamentöse Therapie ermöglichen in vielen Fällen der chronisch entzündlichen Darmerkrankung eine vorübergehende Remission der Erkrankung oder zumindest vorübergehend eine deutliche Erhöhung der Lebensqualität. Ungeachtet dieser Erfolge ist jedoch bei einem großen Teil dieser Patienten im Laufe ihrer Krankheitsgeschichte ein chirurgischer Eingriff notwendig. Bei Morbus Crohn sind ein refraktärer Therapieverlauf, insbesondere bei ileozökalem Befall, Obstruktionen, Darmfisteln, aber auch Perforationen, Abszesse und Blutungen mögliche Indikationen für einen chirurgischen Eingriff. Bei der Colitis ulcerosa steht neben refraktärem Therapieverlauf, Blutungen oder toxischem Megakolon auch die onkologische Prävention im Vordergrund, denn hier ist auch, aufgrund der kontinuierlichen vom Rektum ausgehenden Ausbreitung, eine Heilung durch Proktokolektomie möglich. Bei Morbus Crohn zwingt bei 70 % der Patienten der Verlauf nach 10 Jahren zu einer operativen Intervention, bei Colitis ulcerosa liegt die Wahrscheinlichkeit mit 35% über den gesamten Krankheitsverlauf niedriger (Wehkamp J. 2016).

Neben den kurativen Grenzen der medikamentösen Therapie ist auch der Einsatz der obigen Pharmazeutika in einer Reihe von Fällen kontraindiziert. Dies gilt für empfohlene Medikamente bei schwacher bis mäßiger chronisch entzündlicher Darmerkrankung, wie zum Beispiel bei 5-ASA-Produkten, speziell Sulfasalazin³³, welches kontraindiziert ist für Allergiker und Asthmatiker, oder auch Mesalazin, kontraindiziert bei Leber- und Nierenfunktionsstörungen, als auch insbesondere für den Einsatz von Immunsuppressiva und TNF α -Blockern speziell bei längerer Anwendung. So ist beispielsweise Infliximab kontraindiziert bei Abszessen. Zudem wird zum Beispiel bei Infliximab, einem chimären, human-murinen, monoklonalen Antikörper, die Wirkung bei längeren Einnahmen durch die Entwicklung von Autoantikörpern limitiert.

Eine Blockade des Immunsystems bedeutet auch eine deutliche Erhöhung des Infektionsrisikos bzw. die Gefahr für den Ausbruch vormals ruhender Erkrankungen wie Tuberkulose (Herdegen 2010; Bokemeyer, Hommes et al. 2012). Bereits bei einer Monotherapie mit Kortikosteroiden, Azathioprin oder Infliximab ist das Risiko für einen Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung an einer opportunistischen Infektion zu erkranken um einen Faktor 3 erhöht. Bei einer häufig erforderlichen Kombinationstherapie steigt dieses Risiko noch einmal deutlich an (Toruner, Loftus et al. 2008).

Eine weitere Problematik der obigen medikamentösen Therapie liegt in den teilweise erheblichen Nebenwirkungen der eingesetzten Pharmazeutika. Obwohl allgemein der Einsatz von Sulfasalazin/Mesalazin als sicher und verträglich eingestuft werden kann (Sutherland L 2006), klagen 15% der hiermit behandelten Patienten über Diarrhöen, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erythem und Thrombozytopenie (Dignass, Preiss et al. 2011). Bei Patienten mit Crohn-Colitis führte die hohe Nebenwirkungsrate zu einem Abbruch der Therapie bei 30% der Patienten (Hoffmann, Preiss et al. 2008). Die längerfristige Einnahme von hochdosierten Kortisonpräparaten ist wegen der zu erwartenden Nebenwirkungen (Cushing Syndrom mit Osteoporose, Diabetes Mellitus, Stammfettsucht, Muskelschwund) generell

³³ Sulfasalazin wird im Kolon durch die Azoreduktase in 5-ASA und Sulfapyridin aufgespalten. Sulfapyridin hat zwar auch einen antiinflammatorischen Effekt, ist aber gleichzeitig für einen Großteil der Nebenwirkungen von Sulfasalazin verantwortlich.

kontraindiziert. Nebenwirkungen von Azathioprin schließen Übelkeit, Magen-Darm-Ulzera und eine Pankreatitis ein, welche immerhin bei 3% aller hiermit behandelten Patienten auftritt (Dignass, Preiss et al. 2011). Die auftretende Leukopenie kann jedoch durchaus therapeutisch erwünscht sein. Die im Rahmen einer schweren Colitis ulcerosa eingesetzten Immunsuppressiva (Ciclosporin, Tacrolimus) werden hinsichtlich ihrer Nebenwirkungen als nephrotoxisch, hepatotoxisch sowie neurotoxisch (Parästhesien, Tremor) eingestuft.

Bei einer Monotherapie mit TNF α -Blockern ist von einem primären Therapieversagen von 10-30% auszugehen, ein sekundäres Versagen, das im Verlauf des ersten Behandlungsjahres auftritt, liegt bei 30-40% (Hanauer, Feagan et al. 2002; Colombel, Sandborn et al. 2007; Schreiber, Khaliq-Kareemi et al. 2007). Zudem steigt bei einer Therapie mit TNF α -Blockern das Risiko für Melanome (Long, Martin et al. 2012). Eine Kombinationstherapie von TNF α -Blockern und Thiopurinen erhöht zusätzlich das Risiko von hepato-splenischen T-Zelllymphomen (Deepak, Sifuentes et al. 2013).

Auch für den seit 2014 zugelassenen Wirkstoff Vedolizumab sind eine Reihe von Nebenwirkungen wie unter anderem Kopfschmerzen, Gelenkschmerzen, Bronchitis, Magen-Darm-Entzündungen und Infektionen der oberen Atemwege beschrieben, jedoch war die Häufigkeit dieser Nebenwirkungen vergleichsweise niedrig (Sands, Feagan et al. 2014).

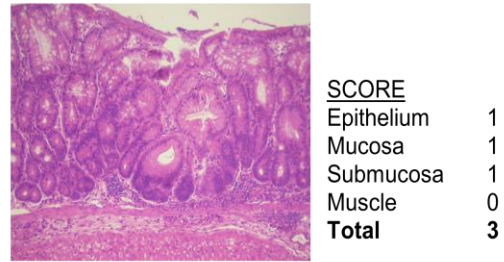
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aktuell eine gut etablierte medikamentöse Therapie bei beiden Formen der chronisch entzündlichen Darmerkrankung existiert. Insbesondere aber angesichts des chronischen Verlaufs dieser Erkrankungen, der eine Behandlung teilweise über mehrere Jahrzehnte notwendig macht und des, insbesondere bei Einsatz von Immunsuppressiva deutlich erhöhten Infektionsrisikos ist, vor dem Hintergrund von potentiellen Nebenwirkungen als auch abnehmender Wirkungsgrade bei wiederholten Anwendungen der bestehenden Therapien, die Suche nach neuen zusätzlichen Wegen zur Erweiterung des therapeutischen Spektrums geboten.

Beispiele und Problematik des Histologie-Scores von Rachmilewitz:

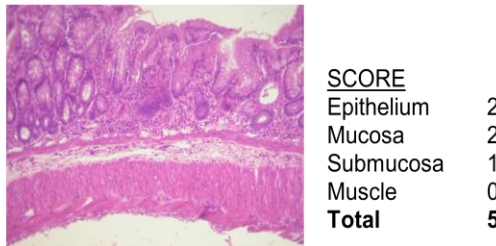
Physiologisches Mausolon



Milde Mauscolitis



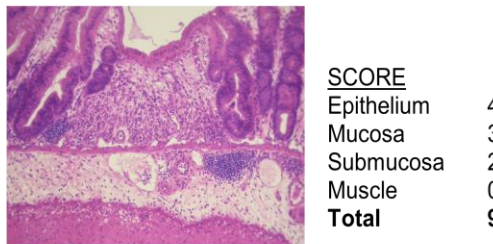
Milde bis moderate Mauscolitis



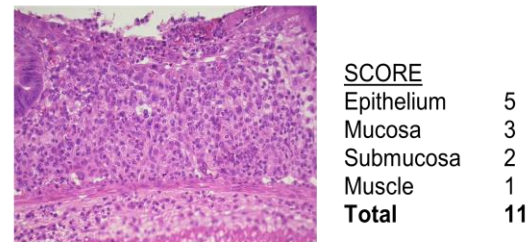
Moderate Mauscolitis



Moderate bis schwere Mauscolitis



Schwere Mauscolitis



Sehr schwere Mauscolitis

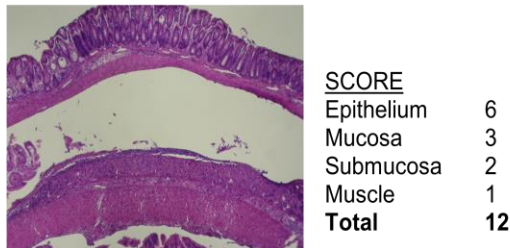


Abb. 32:

Beispielhafte Darstellung der histologischen Bewertung des Endzündungsgeschehens auf der Basis des Scores von Rachmilewitz für verschiedene Endzündungssituationen

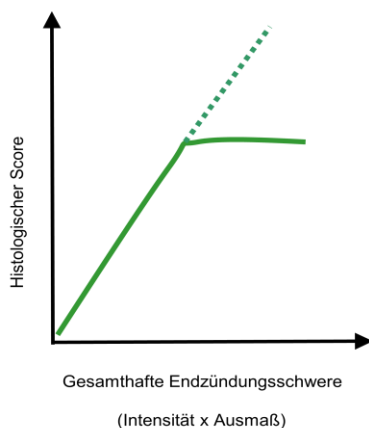


Abb. 33 :

Die Problematik der Histoscores (z.B. Rachmilewitz) hinsichtlich der Abbildung des gesamthaften Entzündungsgeschehens liegt in der „Deckelung“ des Scores ab einer bestimmten Entzündungsschwere

CAI – Disease-Activity-Index nach Siegmund

Mit dem CAI nach Siegmund soll im Rahmen einer experimentellen Colitis die Gesamtsituation der Entzündung in den verschiedenen klinischen Dimensionen in einer Zahl abgebildet werden. Hierzu werden zunächst Körpergewicht, Stuhlkonsistenz und ein Haemocult-Test. Anschließend werden die Mess- und Beobachtungswerte wie folgt kategorisiert:

- Stuhlkonsistenz: 0 = normal,
 - 1 = weich, aber geformt
 - 2 = sehr weich
 - 3 = Diarrhöe

- Haemoccult: 0 = negativer Haemoccult-Test
 - 1 = positiver Haemoccult-Test
 - 2 = sichtbare Blutspuren im Stuhl
 - 3 = rektale Blutungen

- Gewichtsverlust: 0 = 0 – 5 %
 - 1 = 5 – 10 %
 - 2 = 10 – 15 %
 - 3 = 15 – 20 %
 - 4 = > 20 %

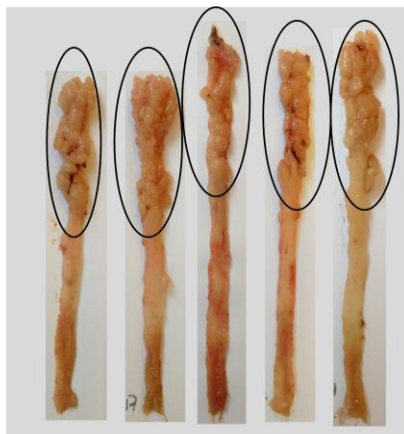
Die Summe der Punkte ermöglicht eine Bewertung der klinischen Gesamtsituation der Entzündung. Das hier verwendete Modell geht zurück auf Siegmund (Siegmund, Rieder et al. 2001)

Kolonentnahmen im Rahmen der Versuchsreihen DSS-AOM-2 und DSS-AOM-3

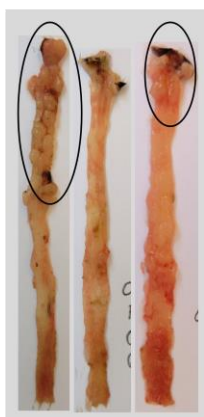
(A1)



(A2)



(B1)



(B2)

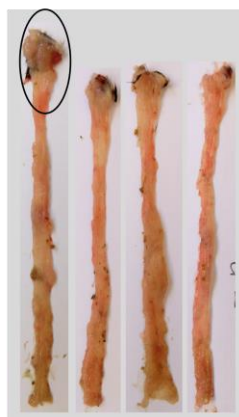


Abb. 34: Kolonentnahme im Rahmen der Versuchsreihen:
(A) DSS-AOM-2 (nach 115 Tagen): für C57BL/6N-Wildtypen (A1) und transgene sgp130Fc-Mäuse (A2)
(B) DSS-AOM-3 (nach 100 Tagen): für C57BL/6N-Wildtypen (B1) und transgene sgp130Fc-Mäuse (B2)
mit Hervorhebung makroskopisch sichtbarer Tumore (O)

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Signalwege von IL-6
- Abb. 2: IL-6-, IL-6R- und sgp130-Konzentration vor und während einer Entzündungssituation
- Abb. 3: Vereinfachte Darstellung des multifaktoriellen Krankheitsgeschehens der chronisch entzündlichen Darmerkrankung
- Abb. 4: Makrophagenrekrutierung in der Entzündung via IL-6 Transsignaling
- Abb. 5: Chronifizierung der Entzündung durch IL-6
- Abb. 6: Möglichkeiten der IL-6-Blockade
- Abb. 7: Schematische Darstellung des DSS-AOM-Krebsmodells
- Abb. 8: Beispielhafte Darstellung der histologischen Bewertung des Entzündungsgeschehens für eine transgene sgp130Fc Maus im Rahmen der DSS-Colitis an Tag 8 nach Start der DSS-Gabe auf Basis der Kolon-Rolle und des Scores von Rachmilewitz
- Abb. 9: Berechnung der relativen Immunzellanteile der Leukozyten auf Basis der Durchflusszytometrie
- Abb. 10: Versuche DSS-1 und DSS-2: Gewichtsverlauf nach 3% DSS-Gabe ins Trinkwasser für 5 Tage
- Abb. 11: Versuchsreihe DSS-1: Stuhlkonsistenz, Haemocult und DAI nach 3% DSS-Gabe ins Trinkwasser für 5 Tage
- Abb. 12: Gewichtsverläufe nach 3%-iger DSS-Gabe ins Trinkwasser für 5 Tage in den Versuchsreihen DSS-3 und DSS-4 sowie dem Pooling beider Versuche
- Abb. 13: Gewichts- und DAI-Verläufe nach 3%-iger DSS-Gabe ins Trinkwasser für 5 Tage in der Versuchsreihe DSS-5
- Abb. 14: Vergleich der relativen Gewichte von inguinalen und mesenterischen Lymphknoten sowie der Milz an Tag 4 und 8 nach DSS-Gabe
- Abb. 15: Vergleich der sgp130-Konzentration in der Mukosa an Tag 4 und 8 bei DSS-Colitis (DSS-Gabe 5 Tage mit 3%) zwischen unbehandelten und mit sgp130Fc injizierten C57BL/6N-Mäusen und transgenen sgp130Fc-Mäusen
- Abb. 16: Histologische Beurteilung der Darmschädigung im Rahmen der DSS-Colitis bei transgenen sgp130Fc-Mäusen und C57BL/6N Wildtypen auf Basis des Histologie-Scores von Rachmilewitz und der Ulzerationsmessung für den Gesamtdarm an Tag 21
- Abb. 17: Vergleich des Rachmilewitz-Scores zur qualitativen Beurteilung der Entzündungsintensität an Tag 4 und 8 für mit und ohne sgp130Fc-injizierte Wildtypen und transgene sgp130Fc-Mäuse bei DSS-Colitis
- Abb. 18: Typische Beispiele der Entzündungsmuster nach DSS-Gabe an Tag 8 für eine transgene sgp130Fc-Maus (A) einen C57BL/6N Wildtyp (B) und einen mit sgp130Fc injizierten C57BL/6N Wildtypen (C) aus der Versuchsreihe DSS 3
- Abb. 19: Ulzerationsmessungen an Tag 8 nach DSS-Gabe in DSS-3, DSS-4 und DSS-5
- Abb. 20: Makrophagenfärbung von beispielhaften Entzündungsregionen des Kolons an Tag 4 der DSS-Colitis für eine C57BL/6N Wildtyp (A), eine transgene sgp130Fc-Maus (B) und einen mit sgp130Fc injizierten C57BL/6N Wildtypen (C)

- Abb. 21: Vergleich der T-Zellanteile an den Leukozyten für den C57BL/6N Wildtyp (A) und den transgenen sgp130Fc-Typen (B) an Tag 0 vor DSS-Gabe auf Basis einer Facs-Analyse
- Abb. 22: Vergleich der Makrophagenanteile an den Leukozyten für den Wildtyp (A) und den transgenen sgp130Fc-Typ (B) an Tag 0 (vor DSS-Gabe) auf Basis einer Facs-Analyse
- Abb. 23: Vergleich der prozentualen Anteile der Granulozyten (Ly6G) an den Leukozyten (CD45) an Tag 4 nach DSS-Gabe für den Wildtyp (A), den transgenen sgp130Fc-Typ (B) und den mit sgp130Fc injizierten Wildtypen (C)
- Abb. 24: Vergleich der prozentualen Anteile der Makrophagen (F4/80) an den Leukozyten (CD45) an Tag 4 nach DSS-Gabe für den Wildtyp (A), den transgenen sgp130Fc-Typ (B) und den mit sgp130Fc injizierten Typ (C)
- Abb. 25: Vergleich der prozentualen Anteile der Granulozyten (Ly6G) an den Leukozyten (CD45) an Tag 8 nach DSS-Gabe für den Wildtyp (A), den transgenen sgp130Fc-Typ (B) und den mit sgp130Fc injizierten Wildtypen (C)
- Abb. 26: Vergleich der prozentualen Anteile der Makrophagen (F4/80) an den Leukozyten (CD45) an Tag 8 nach DSS-Gabe für den Wildtyp (A), den transgenen sgp130Fc-Typ (B) und den mit sgp130Fc injizierten Typ (C)
- Abb. 27: Vergleich der Gewichtsentwicklung von transgenen sgp130Fc-Mäusen mit den C57BL/6N-Wildtypen nach AOM-Gabe an Tag 0 und 2%-iger DSS-Gabe an Tag 5 für 7 Tage im Rahmen der Versuchsreihe DSS-AOM-1
- Abb. 28: Kolonentnahme nach 103 Tagen im Rahmen der Versuchsreihe DSS-AOM-1 für den C57BL/6N-Wildtypen (A) und die transgenen sgp130Fc-Mäuse (B) mit deren sgp130-Konzentration im Serum vor Versuchsbeginn
- Abb. 29: Beispielhafte Darstellung des Kolons von Wildtyp (A) und einer transgenen sgp130Fc-Maus (B) in der Koloskopie (Aufnahme: Sigma-Rektumbereich): Beide Typen zeigen hier einen signifikanten Tumorbefall
- Abb. 30: Zwei illustrative Beispiele der Krebsentwicklung auf der Basis von Schnitten der Kolonrollen in HE-Färbung im Rahmen der Versuchsreihe DSS-AOM-1 nach 103 Tage für den Wildtypen (C57BL/6N) (A) und die transgene sgp130Fc-Maus (B)
- Abb. 31: Histologischer Vergleich der Karzinogenese zwischen unbehandeltem C57BL/6N-Wildtyp und dem transgenen sgp130Fc-Typ nach 103 Tagen im Rahmen der Versuchsreihe DSS-AOM-1 hinsichtlich Tumoranzahl, Tumorload und Tumorgroße
- Abb. 32: Beispielhafte Darstellung der histologischen Bewertung des Entzündungsgeschehens auf der Basis des Scores von Rachmilewitz für verschiedene Entzündungssituationen
- Abb. 33: Die Problematik der Histoscores (z.B. Rachmilewitz) hinsichtlich der Abbildung des gesamthaften Entzündungsgeschehens liegt in der „Deckelung“ des Scores ab einer bestimmten Entzündungsschwere
- Abb. 34: Kolonentnahme im Rahmen der Versuchsreihen:
 (A) DSS-AOM-2 (nach 115 Tagen): für C57BL/6N-Wildtypen (A1) und transgene sgp130Fc-Mäuse (A2)
 (B) DSS-AOM-3 (nach 100 Tagen): für C57BL/6N-Wildtypen (B1) und transgene sgp130Fc-Mäuse (B2) mit Hervorhebung makroskopisch sichtbarer Tumore

Tabellenverzeichnis:

- Tab. 1: Übersicht über die Versuchsreihen zur DSS-Colitisversuche (DSS-1 bis DSS-5)
- Tab. 2: Übersicht über die Versuchsreihen zur DSS-AOM-Darmkarzinogenese (DSS-AOM-1, -2, -3)

Liste wesentlicher verwendeter Materialien und Geräte :

wesentliche Chemikalien:

Dextran Sulfat Natrium (DSS)	TdB Consultancy
Azoxymethan (AOM)	Sigma-Aldrich
Pencillin/Streptomycin (PS)	PAA
EDTA	Gibco
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA
Phosphate buffered saline (PBS)	PAA
Ionomycin	Sigma-Aldrich

wesentliche Antikörper:

PE Rat Antimouse CD11b	BD-Pharmingen
PECy7 Hamster Antimouse CD11c	BD-Pharmingen
APC Hamster Antimouse CD3	BD-Pharmingen
FITC Rat Antimouse CD4	BD-Pharmingen
PE Rat Antimouse CD8a	BD-Pharmingen
PE Rat Antimouse B220	BD-Pharmingen
FITC Rat Antimouse Ly6G	ebioscience
APC Rat Antimouse F4/80	ebioscience
APCCy7 Rat Antimouse CD45	BD-Pharmingen
APCCy7 Rat Antimouse CD45	BD-Pharmingen

ELISA Kits:

DuoSet Mouse IL-6	R&D Systems
DuoSet Mouse IL-6R	R&D Systems
DuoSet Mouse TNF α	R&D Systems
DuoSet Human sgp130	R&D Systems

wesentliche Labor-Instrumente:

BD FACSCanto™ (flow cytometer)	BD Biosciences Pharmingen
Zentrifuge CR3	Jouan
incubator shaker 4000	innova

Abkürzungsverzeichnis:

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
AK	Antikörper
AOM	Azoxymethan
APC	Antigen präsentierende Zellen
ASF	altered Schaedler flora
Bcl-Protein	B-cell lymphoma protein
CAD	Colitis assoziierte Darmkarzinogenese
CD	Clusters of Differentiation
CDAI	Crohn Disease Activity Index
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CLC-1	cardiotrophin-like cytokine 1
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CSF	Colony Stimulating Factor
CU	Colitis ulcerosa
CXC	CX-Chemokine
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DSS	Dextran Sodium Sulfat
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal Calf serum
GALT	gut associated lymphoid tissue
GLP	Glucagon-like peptide
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin 6 Rezeptor
INF	Interferon

JAK	Januskinase
kDA	kilo Dalton
KG	Körpergewicht
LIF	Leukemia inhibitory factor
LP	Lamina propria
LPM	Lamina propria Medium (pro Maus: DNEM+FCS+P/S 25ml, DNase 1,2ml, Kollagenase (D) 15,5 mg)
mAbs	mononuclear antibodies
MAPK	Mitogen activated protein kinase (vormals ERK)
MC	Morbus Crohn
MCP1	Monocyte chemoattractant protein 1
NF-KB	(nuclear factor 'κ-light-chain-enhancer' of activated B-cells) – ein spez. Transkriptionsfaktor
NOD2	Nukleotid-bindende Oligomerisations-Domäne 2
NP	Neuropietin
OSM	Oncostatin M
P3K	Phosphoinositid-3-kinase
PASI	Psoriasis Area Severity Index
PBS	Phosphatgepufferte (physiologische) Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
P/S	Penicillin/Streptomycin Lösung
RA	rheumatoide Arthritis
sgp130Fc	soluble gp130-Fc
SOCS3	Suppressor of cytokine Signaling 3
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TNF	Tumornekrosefaktor
TH	T-Helferzellen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHH	Viktor Hensen Haus (CAU-Kiel)

Literaturverzeichnis:

- An, H. J., E. K. Choi, J. S. Kim, S. W. Hong, J. H. Moon, J. S. Shin, S. H. Ha, K. P. Kim, Y. S. Hong, J. L. Lee, E. K. Choi, J. S. Lee, D. H. Jin and T. W. Kim (2014). "INCB018424 induces apoptotic cell death through the suppression of pJAK1 in human colon cancer cells." *Neoplasma* **61**(1): 56-62.
- Andus, T., F. Klebl, G. Rogler, N. Bregenzner, J. Scholmerich and R. H. Straub (2003). "Patients with refractory Crohn's disease or ulcerative colitis respond to dehydroepiandrosterone: a pilot study." *Aliment Pharmacol Ther* **17**(3): 409-414.
- Arthur, J. C., E. Perez-Chanona, M. Muhlbauer, S. Tomkovich, J. M. Uronis, T. J. Fan, B. J. Campbell, T. Abujamel, B. Dogan, A. B. Rogers, J. M. Rhodes, A. Stintzi, K. W. Simpson, J. J. Hansen, T. O. Keku, A. A. Fodor and C. Jobin (2012). "Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota." *Science* **338**(6103): 120-123.
- Atarashi, K., T. Tanoue, T. Shima, A. Imaoka, T. Kuwahara, Y. Momose, G. Cheng, S. Yamasaki, T. Saito, Y. Ohba, T. Taniguchi, K. Takeda, S. Hori, Ivanov, I., Y. Umesaki, K. Itoh and K. Honda (2011). "Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species." *Science* **331**(6015): 337-341.
- Atreya, R., J. Mudter, S. Finotto, J. Mullberg, T. Jostock, S. Wirtz, M. Schutz, B. Bartsch, M. Holtmann, C. Becker, D. Strand, J. Czaja, J. F. Schlaak, H. A. Lehr, F. Autschbach, G. Schurmann, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, H. Ito, T. Kishimoto, P. R. Galle, S. Rose-John and M. F. Neurath (2000). "Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo." *Nat Med* **6**(5): 583-588.
- Barkhausen, T., T. Tschernig, P. Rosenstiel, M. van Griensven, R. P. Vonberg, M. Dorsch, A. Mueller-Heine, A. Chalaris, J. Scheller, S. Rose-John, D. Seegert, C. Krettek and G. H. Waetzig (2011). "Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model." *Crit Care Med* **39**(6): 1407-1413.
- Becker, C., M. C. Fantini, C. Schramm, H. A. Lehr, S. Wirtz, A. Nikolaev, J. Burg, S. Strand, R. Kiesslich, S. Huber, H. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, P. R. Galle, M. Blessing, S. Rose-John and M. F. Neurath (2004). "TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling." *Immunity* **21**(4): 491-501.
- Becker, C., M. C. Fantini, S. Wirtz, A. Nikolaev, H. A. Lehr, P. R. Galle, S. Rose-John and M. F. Neurath (2005). "IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer." *Cell Cycle* **4**(2): 217-220.
- Best, W. R., J. M. Bechtel, J. W. Singleton and F. Kern, Jr. (1976). "Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study." *Gastroenterology* **70**(3): 439-444.
- Billmann-Born, S., A. Till, A. Arlt, S. Lipinski, C. Sina, A. Latiano, V. Annesse, R. Hasler, M. Kerick, T. Manke, D. Seegert, A. Hanidu, H. Schafer, D. van Heel, J. Li, S. Schreiber and P. Rosenstiel (2011). "Genome-wide expression profiling identifies an impairment of negative feedback signals in the Crohn's disease-associated NOD2 variant L1007fsinsC." *J Immunol* **186**(7): 4027-4038.
- Bode, J. G., U. Albrecht, D. Haussinger, P. C. Heinrich and F. Schaper (2012). "Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-kappaB-dependent signaling." *Eur J Cell Biol* **91**(6-7): 496-505.
- Bokemeyer, B., J. Hardt, D. Huppe, A. Prenzler, S. Conrad, M. Duffelmeyer, P. Hartmann, M. Hoffstadt, T. Klugmann, C. Schmidt, J. Weismuller, T. Mittendorf and H. Raspe (2013). "Clinical status, psychosocial impairments, medical treatment and health care costs for patients with inflammatory bowel disease (IBD) in Germany: An online IBD registry." *J Crohns Colitis* **7**(5): 355-368.
- Bokemeyer, B., D. Hommes, I. Gill, P. Broberg and A. Dignass (2012). "Mesalazine in left-sided ulcerative colitis: efficacy analyses from the PODIUM trial on maintenance of remission and mucosal healing." *J Crohns Colitis* **6**(4): 476-482.
- Bollrath, J., T. J. Phesse, V. A. von Burstin, T. Putoczki, M. Bennecke, T. Bateman, T. Nebelsiek, T. Lundgren-May, O. Canli, S. Schwitalla, V. Matthews, R. M. Schmid, T. Kirchner, M. C. Arkan, M. Ernst and F. R. Greten (2009). "gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis." *Cancer Cell* **15**(2): 91-102.
- Bouma, G. and W. Strober (2003). "The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease." *Nat Rev Immunol* **3**(7): 521-533.

- Calabrese, L. H. and S. Rose-John (2014). "IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease." *Nat Rev Rheumatol* **10**(12): 720-727.
- Campbell, L., C. Chen, S. S. Bhagat, R. A. Parker and A. J. Ostor (2011). "Risk of adverse events including serious infections in rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab: a systematic literature review and meta-analysis of randomized controlled trials." *Rheumatology (Oxford)* **50**(3): 552-562.
- Chalaris, A., N. Adam, C. Sina, P. Rosenstiel, J. Lehmann-Koch, P. Schirmacher, D. Hartmann, J. Cichy, O. Gavrilova, S. Schreiber, T. Jostock, V. Matthews, R. Hasler, C. Becker, M. F. Neurath, K. Reiss, P. Saftig, J. Scheller and S. Rose-John (2010). "Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice." *J Exp Med* **207**(8): 1617-1624.
- Chalaris, A., C. Garbers, B. Rabe, S. Rose-John and J. Scheller (2011). "The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer." *Eur J Cell Biol* **90**(6-7): 484-494.
- Chalaris, A., D. Schmidt-Arras, K. Yamamoto and S. Rose-John (2012). "Interleukin-6 trans-signaling and colonic cancer associated with inflammatory bowel disease." *Dig Dis* **30**(5): 492-499.
- Colombel, J. F., W. J. Sandborn, P. Rutgeerts, R. Enns, S. B. Hanauer, R. Panaccione, S. Schreiber, D. Byczkowski, J. Li, J. D. Kent and P. F. Pollack (2007). "Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial." *Gastroenterology* **132**(1): 52-65.
- Couturier-Maillard, A., T. Secher, A. Rehman, S. Normand, A. De Arcangelis, R. Haesler, L. Huot, T. Grandjean, A. Bressenot, A. Delanoye-Crespin, O. Gaillot, S. Schreiber, Y. Lemoine, B. Ryffel, D. Hot, G. Nunez, G. Chen, P. Rosenstiel and M. Chamaillard (2013). "NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer." *J Clin Invest* **123**(2): 700-711.
- De Benedetti, F., M. Massa, P. Pignatti, S. Albani, D. Novick and A. Martini (1994). "Serum soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6/soluble IL-6 receptor complex in systemic juvenile rheumatoid arthritis." *J Clin Invest* **93**(5): 2114-2119.
- Debeuckelaere, C., P. De Munter, P. Van Bleyenbergh, W. De Wever, G. Van Assche, P. Rutgeerts and S. Vermeire (2014). "Tuberculosis infection following anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease, despite negative screening." *J Crohns Colitis* **8**(6): 550-557.
- Deepak, P., H. Sifuentes, M. Sherid, D. Stobaugh, Y. Sadozai and E. D. Ehrenpreis (2013). "T-cell non-Hodgkin's lymphomas reported to the FDA AERS with tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) inhibitors: results of the REFURBISH study." *Am J Gastroenterol* **108**(1): 99-105.
- Di Lernia, V., C. Ricci, A. Lallas and E. Ficarelli (2014). "Clinical predictors of non-response to any tumor necrosis factor (TNF) blockers: a retrospective study." *J Dermatolog Treat* **25**(1): 73-74.
- Dieleman, L. A., B. U. Ridwan, G. S. Tennyson, K. W. Beagley, R. P. Bucy and C. O. Elson (1994). "Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice." *Gastroenterology* **107**(6): 1643-1652.
- Dignass, A., J. C. Preiss, D. E. Aust, F. Autschbach, A. Ballauff, G. Barretton, B. Bokemeyer, S. Fichtner-Feigl, S. Hagel, K. R. Herrlinger, G. Jantschek, A. Kroesen, W. Kruis, T. Kucharzik, J. Langhorst, M. Reinshagen, G. Rogler, D. Schleiermacher, C. Schmidt, S. Schreiber, H. Schulze, E. Stange, M. Zeitz, J. C. Hoffmann and A. Stallmach (2011). "[Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011]." *Z Gastroenterol* **49**(9): 1276-1341.
- Dominitzki, S., M. C. Fantini, C. Neufert, A. Nikolaev, P. R. Galle, J. Scheller, G. Monteleone, S. Rose-John, M. F. Neurath and C. Becker (2007). "Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells." *J Immunol* **179**(4): 2041-2045.
- Dretzke, J., R. Edlin, J. Round, M. Connock, C. Hulme, J. Czczot, A. Fry-Smith, C. McCabe and C. Meads (2011). "A systematic review and economic evaluation of the use of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) inhibitors, adalimumab and infliximab, for Crohn's disease." *Health Technol Assess* **15**(6): 1-244.
- Egger, B., M. W. Buchler, J. Lakshmanan, P. Moore and V. E. Eysselein (2000). "Mice harboring a defective epidermal growth factor receptor (waved-2) have an increased susceptibility to acute dextran sulfate-induced colitis." *Scand J Gastroenterol* **35**(11): 1181-1187.
- Ellingsgaard, H., J. A. Ehses, E. B. Hammar, L. Van Lommel, R. Quintens, G. Martens, J. Kerr-Conte, F. Pattou, T. Berney, D. Pipeleers, P. A. Halban, F. C. Schuit and M. Y. Donath (2008). "Interleukin-6 regulates pancreatic alpha-cell mass expansion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(35): 13163-13168.

- Ellingsgaard, H., I. Hauselmann, B. Schuler, A. M. Habib, L. L. Baggio, D. T. Meier, E. Eppler, K. Bouzakri, S. Wueest, Y. D. Muller, A. M. Hansen, M. Reinecke, D. Konrad, M. Gassmann, F. Reimann, P. A. Halban, J. Gromada, D. J. Drucker, F. M. Gribble, J. A. Ehses and M. Y. Donath (2011). "Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells." *Nat Med* **17**(11): 1481-1489.
- Elson, C. O., Y. Cong, V. J. McCracken, R. A. Dimmitt, R. G. Lorenz and C. T. Weaver (2005). "Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota." *Immunol Rev* **206**: 260-276.
- Feagan, B. G., P. Rutgeerts, B. E. Sands, S. Hanauer, J. F. Colombel, W. J. Sandborn, G. Van Assche, J. Axler, H. J. Kim, S. Danese, I. Fox, C. Milch, S. Sankoh, T. Wyant, J. Xu, A. Parikh and G. S. Group (2013). "Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis." *N Engl J Med* **369**(8): 699-710.
- Ferguson, L. R., A. N. Shelling, B. L. Browning, C. Huebner and I. Petermann (2007). "Genes, diet and inflammatory bowel disease." *Mutat Res* **622**(1-2): 70-83.
- Franchimont, N., V. Gangji, D. Durant and E. Canalis (1997). "Interleukin-6 with its soluble receptor enhances the expression of insulin-like growth factor-I in osteoblasts." *Endocrinology* **138**(12): 5248-5255.
- Franke, A., T. Balschun, T. H. Karlsen, J. Hedderich, S. May, T. Lu, D. Schuldt, S. Nikolaus, P. Rosenstiel, M. Krawczak and S. Schreiber (2008). "Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis." *Nat Genet* **40**(6): 713-715.
- Fuss, I. J., F. Heller, M. Boirivant, F. Leon, M. Yoshida, S. Fichtner-Feigl, Z. Yang, M. Exley, A. Kitani, R. S. Blumberg, P. Mannon and W. Strober (2004). "Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis." *J Clin Invest* **113**(10): 1490-1497.
- Galun, E. and S. Rose-John (2013). "The regenerative activity of interleukin-6." *Methods Mol Biol* **982**: 59-77.
- Garbers, C., W. Thaiss, G. W. Jones, G. H. Waetzig, I. Lorenzen, F. Guilhot, R. Lissilaa, W. G. Ferlin, J. Grotzinger, S. A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller (2011). "Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor." *J Biol Chem* **286**(50): 42959-42970.
- Gauldie, J., C. Richards and H. Baumann (1992). "IL6 and the acute phase reaction." *Res Immunol* **143**(7): 755-759.
- Geuking, M. B., J. Cahenzli, M. A. Lawson, D. C. Ng, E. Slack, S. Hapfelmeier, K. D. McCoy and A. J. Macpherson (2011). "Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses." *Immunity* **34**(5): 794-806.
- Grivennikov, S., E. Karin, J. Terzic, D. Mucida, G. Y. Yu, S. Vallabhapurapu, J. Scheller, S. Rose-John, H. Cheroutre, L. Eckmann and M. Karin (2009). "IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer." *Cancer Cell* **15**(2): 103-113.
- Grivennikov, S. and M. Karin (2008). "Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis?" *Cancer Cell* **13**(1): 7-9.
- Gueimonde, M., A. Ouwehand, H. Huhtinen, E. Salminen and S. Salminen (2007). "Qualitative and quantitative analyses of the bifidobacterial microbiota in the colonic mucosa of patients with colorectal cancer, diverticulitis and inflammatory bowel disease." *World J Gastroenterol* **13**(29): 3985-3989.
- Hampe, J., A. Franke, P. Rosenstiel, A. Till, M. Teuber, K. Huse, M. Albrecht, G. Mayr, F. M. De La Vega, J. Briggs, S. Gunther, N. J. Prescott, C. M. Onnie, R. Hasler, B. Sipos, U. R. Folsch, T. Lengauer, M. Platzer, C. G. Mathew, M. Krawczak and S. Schreiber (2007). "A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1." *Nat Genet* **39**(2): 207-211.
- Hampe, J., H. Frenzel, M. M. Mirza, P. J. Croucher, A. Cuthbert, S. Mascheretti, K. Huse, M. Platzer, S. Bridger, B. Meyer, P. Nurnberg, P. Stokkers, M. Krawczak, C. G. Mathew, M. Curran and S. Schreiber (2002). "Evidence for a NOD2-independent susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16p." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 321-326.

- Hanauer, S. B., B. G. Feagan, G. R. Lichtenstein, L. F. Mayer, S. Schreiber, J. F. Colombel, D. Rachmilewitz, D. C. Wolf, A. Olson, W. Bao, P. Rutgeerts and A. I. S. Group (2002). "Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial." *Lancet* **359**(9317): 1541-1549.
- Hendrickson, B. A., R. Gokhale and J. H. Cho (2002). "Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease." *Clin Microbiol Rev* **15**(1): 79-94.
- Herdegen, T. (2010). Immunomodulatoren und Immunsuppressiva. *Kurzlehrbuch: Pharmakologie und Toxikologie 2. Auflage*. T. Herdegen. Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 284 - 306.
- Hermann, E., B. Fleischer, W. J. Mayet, T. Poralla and K. H. Meyer zum Buschenfelde (1989). "Correlation of synovial fluid interleukin 6 (IL-6) activities with IgG concentrations in patients with inflammatory joint disease and osteoarthritis." *Clin Exp Rheumatol* **7**(4): 411-414.
- Ho, G. T., P. Chiam, H. Drummond, J. Loane, I. D. Arnott and J. Satsangi (2006). "The efficacy of corticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: analysis of a 5-year UK inception cohort." *Aliment Pharmacol Ther* **24**(2): 319-330.
- Hoffmann, J. C., J. C. Preiss, F. Autschbach, H. J. Buhr, W. Hauser, K. Herrlinger, W. Hohne, S. Koletzko, C. F. Krieglstein, W. Kruis, H. Matthes, G. Moser, M. Reinshagen, G. Rogler, S. Schreiber, A. G. Schreyer, B. Sido, B. Siegmund, A. Stallmach, B. Bokemeyer, E. F. Stange and M. Zeitz (2008). "[Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease]." *Z Gastroenterol* **46**(9): 1094-1146.
- Hoge, J., I. Yan, N. Janner, V. Schumacher, A. Chalaris, O. M. Steinmetz, D. R. Engel, J. Scheller, S. Rose-John and H. W. Mittrucker (2013). "IL-6 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes* via classical IL-6 signaling." *J Immunol* **190**(2): 703-711.
- Holtmann, M. H., E. Douni, M. Schutz, G. Zeller, J. Mudter, H. A. Lehr, J. Gerspach, P. Scheurich, P. R. Galle, G. Kollias and M. F. Neurath (2002). "Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo." *Eur J Immunol* **32**(11): 3142-3151.
- Hotamisligil, G. S., P. Arner, J. F. Caro, R. L. Atkinson and B. M. Spiegelman (1995). "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance." *J Clin Invest* **95**(5): 2409-2415.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill and B. M. Spiegelman (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." *Science* **259**(5091): 87-91.
- Hueber, W., B. E. Sands, S. Lewitzky, M. Vandemeulebroecke, W. Reinisch, P. D. Higgins, J. Wehkamp, B. G. Feagan, M. D. Yao, M. Karczewski, J. Karczewski, N. Pezous, S. Bek, G. Bruin, B. Mellgard, C. Berger, M. Londei, A. P. Bertolino, G. Tougas, S. P. Travis and G. Secukinumab in Crohn's Disease Study (2012). "Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial." *Gut* **61**(12): 1693-1700.
- Hyams, J. S., J. E. Fitzgerald, W. R. Treem, N. Wyzga and D. L. Kreutzer (1993). "Relationship of functional and antigenic interleukin 6 to disease activity in inflammatory bowel disease." *Gastroenterology* **104**(5): 1285-1292.
- Isaacs, K. L. and R. B. Sartor (2004). "Treatment of inflammatory bowel disease with antibiotics." *Gastroenterol Clin North Am* **33**(2): 335-345.
- Ito, H. (2005). "Treatment of Crohn's disease with anti-IL-6 receptor antibody." *J Gastroenterol* **40 Suppl 16**: 32-34.
- Ito, H., T. Hirotsu, M. Yamamoto, H. Ogawa and T. Kishimoto (2002). "Anti-IL-6 receptor monoclonal antibody inhibits leukocyte recruitment and promotes T-cell apoptosis in a murine model of Crohn's disease." *J Gastroenterol* **37 Suppl 14**: 56-61.
- Ito, H., M. Takazoe, Y. Fukuda, T. Hibi, K. Kusugami, A. Andoh, T. Matsumoto, T. Yamamura, J. Azuma, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Shimoyama and T. Kishimoto (2004). "A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease." *Gastroenterology* **126**(4): 989-996.
- Ito, R., M. Kita, M. Shin-Ya, T. Kishida, A. Urano, R. Takada, J. Sakagami, J. Imanishi, Y. Iwakura, T. Okanoue, T. Yoshikawa, K. Kataoka and O. Mazda (2008). "Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice." *Biochem Biophys Res Commun* **377**(1): 12-16.

- Ivanov, I., K. Atarashi, N. Manel, E. L. Brodie, T. Shima, U. Karaoz, D. Wei, K. C. Goldfarb, C. A. Santee, S. V. Lynch, T. Tanoue, A. Imaoka, K. Itoh, K. Takeda, Y. Umesaki, K. Honda and D. R. Littman (2009). "Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria." *Cell* **139**(3): 485-498.
- Ivanov, I., L. Frutos Rde, N. Manel, K. Yoshinaga, D. B. Rifkin, R. B. Sartor, B. B. Finlay and D. R. Littman (2008). "Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine." *Cell Host Microbe* **4**(4): 337-349.
- Ivanov, I., B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua and D. R. Littman (2006). "The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." *Cell* **126**(6): 1121-1133.
- Jenkins, S. J., D. Ruckerl, P. C. Cook, L. H. Jones, F. D. Finkelman, N. van Rooijen, A. S. MacDonald and J. E. Allen (2011). "Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation." *Science* **332**(6035): 1284-1288.
- Jones, S. A., D. Novick, S. Horiuchi, N. Yamamoto, A. J. Szalai and G. M. Fuller (1999). "C-reactive protein: a physiological activator of interleukin 6 receptor shedding." *J Exp Med* **189**(3): 599-604.
- Jones, S. A., J. Scheller and S. Rose-John (2011). "Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling." *J Clin Invest* **121**(9): 3375-3383.
- Jostock, T., J. Mullberg, S. Ozbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M. F. Neurath and S. Rose-John (2001). "Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses." *Eur J Biochem* **268**(1): 160-167.
- Kamada, N. and G. Nunez (2013). "Role of the gut microbiota in the development and function of lymphoid cells." *J Immunol* **190**(4): 1389-1395.
- Kamada, N., S. U. Seo, G. Y. Chen and G. Nunez (2013). "Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease." *Nat Rev Immunol* **13**(5): 321-335.
- Karin, M. and F. R. Greten (2005). "NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression." *Nat Rev Immunol* **5**(10): 749-759.
- Kaser, A., A. H. Lee, A. Franke, J. N. Glickman, S. Zeissig, H. Tilg, E. E. Nieuwenhuis, D. E. Higgins, S. Schreiber, L. H. Glimcher and R. S. Blumberg (2008). "XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease." *Cell* **134**(5): 743-756.
- Kawalec, P., A. Mikrut, N. Wisniewska and A. Pilc (2013). "Tumor necrosis factor- α antibodies (infliximab, adalimumab and certolizumab) in Crohn's disease: systematic review and meta-analysis." *Arch Med Sci* **9**(5): 765-779.
- Knupfer, H. and R. Preiss (2010). "Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients--a summary of published results." *Int J Colorectal Dis* **25**(2): 135-140.
- Kojima, M., T. Morisaki, N. Sasaki, K. Nakano, R. Mibu, M. Tanaka and M. Katano (2004). "Increased nuclear factor- κ B activation in human colorectal carcinoma and its correlation with tumor progression." *Anticancer Res* **24**(2B): 675-681.
- Kraakman, M. J., T. L. Allen, M. Whitham, P. Iliades, H. L. Kammoun, E. Estevez, G. I. Lancaster and M. A. Febbraio (2013). "Targeting gp130 to prevent inflammation and promote insulin action." *Diabetes Obes Metab* **15 Suppl 3**: 170-175.
- Kraakman, M. J., H. L. Kammoun, T. L. Allen, V. Deswaerte, D. C. Henstridge, E. Estevez, V. B. Matthews, B. Neill, D. A. White, A. J. Murphy, L. Peijs, C. Yang, S. Risis, C. R. Bruce, X. J. Du, A. Bobik, R. S. Lee-Young, B. A. Kingwell, A. Vasanthakumar, W. Shi, A. Kallies, G. I. Lancaster, S. Rose-John and M. A. Febbraio (2015). "Blocking IL-6 trans-signaling prevents high-fat diet-induced adipose tissue macrophage recruitment but does not improve insulin resistance." *Cell Metab* **21**(3): 403-416.
- Kraus, S. and N. Arber (2009). "Inflammation and colorectal cancer." *Curr Opin Pharmacol* **9**(4): 405-410.
- Kuhn, K. A., N. A. Manieri, T. C. Liu and T. S. Stappenbeck (2014). "IL-6 stimulates intestinal epithelial proliferation and repair after injury." *PLoS One* **9**(12): e114195.
- Lee, H., A. Herrmann, J. H. Deng, M. Kujawski, G. Niu, Z. Li, S. Forman, R. Jove, D. M. Pardoll and H. Yu (2009). "Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF- κ B activity in tumors." *Cancer Cell* **15**(4): 283-293.
- Lissilaa, R., V. Buatois, G. Magistrelli, A. S. Williams, G. W. Jones, S. Herren, L. Shang, P. Malinge, F. Guilhot, L. Chatel, E. Hatterer, S. A. Jones, M. H. Kosco-Vilbois and W. G. Ferlin (2010). "Although IL-6 trans-

- signaling is sufficient to drive local immune responses, classical IL-6 signaling is obligate for the induction of T cell-mediated autoimmunity." *J Immunol* **185**(9): 5512-5521.
- Loftus, E. V., Jr., D. J. Delgado, H. S. Friedman and W. J. Sandborn (2008). "Colectomy and the incidence of postsurgical complications among ulcerative colitis patients with private health insurance in the United States." *Am J Gastroenterol* **103**(7): 1737-1745.
- Long, M. D., C. F. Martin, C. A. Pipkin, H. H. Herfarth, R. S. Sandler and M. D. Kappelman (2012). "Risk of melanoma and nonmelanoma skin cancer among patients with inflammatory bowel disease." *Gastroenterology* **143**(2): 390-399
- Louis, E., J. Belaiche, C. van Kemseke, D. Franchimont, D. de Groote, V. Gueenen and J. Y. Mary (1997). "A high serum concentration of interleukin-6 is predictive of relapse in quiescent Crohn's disease." *Eur J Gastroenterol Hepatol* **9**(10): 939-944.
- Lowe, A. M., P. O. Roy, B. P. M, P. Michel, A. Bitton, L. St-Onge and P. Brassard (2009). "Epidemiology of Crohn's disease in Quebec, Canada." *Inflamm Bowel Dis* **15**(3): 429-435.
- Lumeng, C. N., J. L. Bodzin and A. R. Saltiel (2007). "Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization." *J Clin Invest* **117**(1): 175-184.
- MacDonald, T. T. (2003). "The mucosal immune system." *Parasite Immunol* **25**(5): 235-246.
- Madhok, R., A. Crilly, J. Watson and H. A. Capell (1993). "Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity." *Ann Rheum Dis* **52**(3): 232-234.
- Maini, R. N., P. C. Taylor, J. Szechinski, K. Pavelka, J. Broll, G. Balint, P. Emery, F. Raemen, J. Petersen, J. Smolen, D. Thomson, T. Kishimoto and C. S. Group (2006). "Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate." *Arthritis Rheum* **54**(9): 2817-2829.
- Matsumoto, S., T. Hara, K. Mitsuyama, M. Yamamoto, O. Tsuruta, M. Sata, J. Scheller, S. Rose-John, S. Kado and T. Takada (2010). "Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model." *J Immunol* **184**(3): 1543-1551.
- Matthews, V. B., T. L. Allen, S. Risis, M. H. Chan, D. C. Henstridge, N. Watson, L. A. Zaffino, J. R. Babb, J. Boon, P. J. Meikle, J. B. Jowett, M. J. Watt, J. O. Jansson, C. R. Bruce and M. A. Febbraio (2010). "Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance." *Diabetologia* **53**(11): 2431-2441.
- Mauer, J., B. Chaurasia, J. Goldau, M. C. Vogt, J. Ruud, K. D. Nguyen, S. Theurich, A. C. Hausen, J. Schmitz, H. S. Bronneke, E. Estevez, T. L. Allen, A. Mesaros, L. Partridge, M. A. Febbraio, A. Chawla, F. T. Wunderlich and J. C. Bruning (2014). "Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin." *Nat Immunol* **15**(5): 423-430.
- Mekada, K., K. Abe, A. Murakami, S. Nakamura, H. Nakata, K. Moriwaki, Y. Obata and A. Yoshiki (2009). "Genetic differences among C57BL/6 substrains." *Exp Anim* **58**(2): 141-149.
- Mitsuyama, K., A. Toyonaga, E. Sasaki, O. Ishida, H. Ikeda, O. Tsuruta, K. Harada, H. Tateishi, T. Nishiyama and K. Tanikawa (1995). "Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6." *Gut* **36**(1): 45-49.
- Mizoguchi, A. (2012). "Animal models of inflammatory bowel disease." *Prog Mol Biol Transl Sci* **105**: 263-320.
- Mosli, M. H. and B. G. Feagan (2013). "Vedolizumab for Crohn's disease." *Expert Opin Biol Ther* **13**(3): 455-463.
- Mudter, J. and M. F. Neurath (2007). "IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance." *Inflamm Bowel Dis* **13**(8): 1016-1023.
- Mullberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1993). "The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding." *Eur J Immunol* **23**(2): 473-480.
- Murray, P. J. and T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." *Nat Rev Immunol* **11**(11): 723-737.

- Navarro, G., S. Taroumian, N. Barroso, L. Duan and D. Furst (2014). "Tocilizumab in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of efficacy and selected clinical conundrums." *Semin Arthritis Rheum* **43**(4): 458-469.
- Neurath, M. F., I. Fuss, B. L. Kelsall, E. Stuber and W. Strober (1995). "Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice." *J Exp Med* **182**(5): 1281-1290.
- Neurath, M. F., B. Weigmann, S. Finotto, J. Glickman, E. Nieuwenhuis, H. Iijima, A. Mizoguchi, E. Mizoguchi, J. Mudter, P. R. Galle, A. Bhan, F. Autschbach, B. M. Sullivan, S. J. Szabo, L. H. Glimcher and R. S. Blumberg (2002). "The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease." *J Exp Med* **195**(9): 1129-1143.
- Nishimoto, N., Y. Kanakura, K. Aozasa, T. Johkoh, M. Nakamura, S. Nakano, N. Nakano, Y. Ikeda, T. Sasaki, K. Nishioka, M. Hara, H. Taguchi, Y. Kimura, Y. Kato, H. Asaoku, S. Kumagai, F. Kodama, H. Nakahara, K. Hagihara, K. Yoshizaki and T. Kishimoto (2005). "Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease." *Blood* **106**(8): 2627-2632.
- Nowell, M. A., P. J. Richards, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, N. Topley, A. S. Williams and S. A. Jones (2003). "Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130." *J Immunol* **171**(6): 3202-3209.
- Okayasu, I., S. Hatakeyama, M. Yamada, T. Ohkusa, Y. Inagaki and R. Nakaya (1990). "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice." *Gastroenterology* **98**(3): 694-702.
- Ott, C., F. Obermeier, S. Thiel, D. Kemptner, A. Bauer, J. Scholmerich, G. Rogler and A. Timmer (2008). "The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study." *Eur J Gastroenterol Hepatol* **20**(9): 917-923.
- Parikh, A., I. Fox, T. Leach, J. Xu, C. Scholz, M. Patella and B. G. Feagan (2013). "Long-term clinical experience with vedolizumab in patients with inflammatory bowel disease." *Inflamm Bowel Dis* **19**(8): 1691-1699.
- Parkes, M., J. C. Barrett, N. J. Prescott, M. Tremelling, C. A. Anderson, S. A. Fisher, R. G. Roberts, E. R. Nimmo, F. R. Cummings, D. Soars, H. Drummond, C. W. Lees, S. A. Khawaja, R. Bagnall, D. A. Burke, C. E. Todhunter, T. Ahmad, C. M. Onnie, W. McArdle, D. Strachan, G. Bethel, C. Bryan, C. M. Lewis, P. Deloukas, A. Forbes, J. Sanderson, D. P. Jewell, J. Satsangi, J. C. Mansfield, C. Wellcome Trust Case Control, L. Cardon and C. G. Mathew (2007). "Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility." *Nat Genet* **39**(7): 830-832.
- Patsouris, D., P. P. Li, D. Thapar, J. Chapman, J. M. Olefsky and J. G. Neels (2008). "Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals." *Cell Metab* **8**(4): 301-309.
- Pedersen, B. K. and M. A. Febbraio (2008). "Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6." *Physiol Rev* **88**(4): 1379-1406.
- Peloquin, J. M. and D. D. Nguyen (2013). "The microbiota and inflammatory bowel disease: Insights from animal models." *Anaerobe* **24**: 102-106.
- Peters, M., A. M. Muller and S. Rose-John (1998). "Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis." *Blood* **92**(10): 3495-3504.
- Podolsky, D. K. (2002). "Inflammatory bowel disease." *N Engl J Med* **347**(6): 417-429.
- Polgar, A., M. Brozik, S. Toth, M. Holub, K. Hegyi, A. Kadar, L. Hodinka and A. Falus (2000). "Soluble interleukin-6 receptor in plasma and in lymphocyte culture supernatants of healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis." *Med Sci Monit* **6**(1): 13-18.
- Prenzler, A., B. Bokemeyer, T. Mittendorf and J. M. von der Schulenburg (2010). "[Costs of ulcerative colitis within the German Statutory Health Insurance]." *Dtsch Med Wochenschr* **135**(7): 281-286.
- Prenzler, A., B. Bokemeyer, J. M. von der Schulenburg and T. Mittendorf (2011). "Health care costs and their predictors of inflammatory bowel diseases in Germany." *Eur J Health Econ* **12**(3): 273-283.
- Prenzler, A., T. Mittendorf, S. Conrad, J. M. von der Schulenburg and B. Bokemeyer (2009). "[Costs of Crohn's disease in Germany from the perspective of the Statutory Health Insurance]." *Z Gastroenterol* **47**(7): 659-666.

- Prenzler, A. B., B. Mittedorf, T. et. al. (2010). "Kosten der Colitis ulcerosa - eine Kalkulation aus der Perspektive der gesetzlichen Krankenversicherung." Deutsche Medizinische Wochenschrift **135**: 281 - 286.
- Qualls, J. E., A. M. Kaplan, N. van Rooijen and D. A. Cohen (2006). "Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes." J Leukoc Biol **80**(4): 802-815.
- Rabe, B., A. Chalaris, U. May, G. H. Waetzig, D. Seeger, A. S. Williams, S. A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller (2008). "Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation." Blood **111**(3): 1021-1028.
- Rachmilewitz, D., F. Karmeli, K. Takabayashi, T. Hayashi, L. Leider-Trejo, J. Lee, L. M. Leoni and E. Raz (2002). "Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis." Gastroenterology **122**(5): 1428-1441.
- Rath, H. C., M. Schultz, R. Freitag, L. A. Dieleman, F. Li, H. J. Linde, J. Scholmerich and R. B. Sartor (2001). "Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice." Infect Immun **69**(4): 2277-2285.
- Reinisch, W., C. Gasche, W. Tillinger, J. Wyatt, C. Lichtenberger, M. Willheim, C. Dejaco, T. Waldhor, S. Bakos, H. Vogelsang, A. Gangl and H. Lochs (1999). "Clinical relevance of serum interleukin-6 in Crohn's disease: single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse." Am J Gastroenterol **94**(8): 2156-2164.
- Rosch, M., R. Leidl, C. Tirpitz, M. Reinshagen, G. Adler and H. H. König (2002). "[Cost measurement based on a cost diary in patients with inflammatory bowel disease]." Z Gastroenterol **40**(4): 217-228.
- Rose-John, S. (2012). "IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6." Int J Biol Sci **8**(9): 1237-1247.
- Sands, B. E., B. G. Feagan, P. Rutgeerts, J. F. Colombel, W. J. Sandborn, R. Sy, G. D'Haens, S. Ben-Horin, J. Xu, M. Rosario, I. Fox, A. Parikh, C. Milch and S. Hanauer (2014). "Effects of vedolizumab induction therapy for patients with Crohn's disease in whom tumor necrosis factor antagonist treatment failed." Gastroenterology **147**(3): 618-627 e613.
- Sartor, R. B. (2001). "Intestinal microflora in human and experimental inflammatory bowel disease." Curr Opin Gastroenterol **17**(4): 324-330.
- Sartor, R. B. (2011). "Efficacy of probiotics for the management of inflammatory bowel disease." Gastroenterol Hepatol (N Y) **7**(9): 606-608.
- Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras and S. Rose-John (2011). "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." Biochim Biophys Acta **1813**(5): 878-888.
- Schiff, M. H., J. M. Kremer, A. Jahreis, E. Vernon, J. D. Isaacs and R. F. van Vollenhoven (2011). "Integrated safety in tocilizumab clinical trials." Arthritis Res Ther **13**(5): R141.
- Schreiber, S., M. Khaliq-Kareemi, I. C. Lawrance, O. O. Thomsen, S. B. Hanauer, J. McColm, R. Bloomfield, W. J. Sandborn and P. S. Investigators (2007). "Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease." N Engl J Med **357**(3): 239-250.
- Schreiber, S., I. C. Lawrance, O. O. Thomsen, S. B. Hanauer, R. Bloomfield and W. J. Sandborn (2011). "Randomised clinical trial: certolizumab pegol for fistulas in Crohn's disease - subgroup results from a placebo-controlled study." Aliment Pharmacol Ther **33**(2): 185-193.
- Schreiber, S., P. Rosenstiel, M. Albrecht, J. Hampe and M. Krawczak (2005). "Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease." Nat Rev Genet **6**(5): 376-388.
- Seavey, M. M., L. D. Lu, K. L. Stump, N. H. Wallace, W. Hockeimer, T. M. O'Kane, B. A. Ruggeri and P. Dobrzanski (2012). "Therapeutic efficacy of CEP-33779, a novel selective JAK2 inhibitor, in a mouse model of colitis-induced colorectal cancer." Mol Cancer Ther **11**(4): 984-993.
- Shanahan, F. (2002). "Crohn's disease." Lancet **359**(9300): 62-69.
- Shivananda, S., J. Lennard-Jones, R. Logan, N. Fear, A. Price, L. Carpenter and M. van Blankenstein (1996). "Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD)." Gut **39**(5): 690-697.
- Siegmund, B., F. Rieder, S. Albrich, K. Wolf, C. Bidlingmaier, G. S. Firestein, D. Boyle, H. A. Lehr, F. Loher, G. Hartmann, S. Endres and A. Eigler (2001). "Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice." J Pharmacol Exp Ther **296**(1): 99-105.

- Smolen, J. S., A. Beaulieu, A. Rubbert-Roth, C. Ramos-Remus, J. Rovensky, E. Alecock, T. Woodworth, R. Alten and O. Investigators (2008). "Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial." Lancet **371**(9617): 987-997.
- Sodenkamp, J., G. H. Waetzig, J. Scheller, D. Seegert, J. Grotzinger, S. Rose-John, S. Ehlers and C. Holscher (2012). "Therapeutic targeting of interleukin-6 trans-signaling does not affect the outcome of experimental tuberculosis." Immunobiology **217**(10): 996-1004.
- Sommer, J., E. Engelowski, P. Baran, C. Garbers, D. M. Floss and J. Scheller (2014). "Interleukin-6, but not the interleukin-6 receptor plays a role in recovery from dextran sodium sulfate-induced colitis." Int J Mol Med **34**(3): 651-660.
- Spehlmann, M. E., A. Z. Begun, J. Burghardt, P. Lepage, A. Raedler and S. Schreiber (2008). "Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study." Inflamm Bowel Dis **14**(7): 968-976.
- Stark, R., H. H. König and R. Leidl (2006). "Costs of inflammatory bowel disease in Germany." Pharmacoeconomics **24**(8): 797-814.
- Straub, R. H., L. Konecna, S. Hrach, G. Rothe, M. Kreutz, J. Scholmerich, W. Falk and B. Lang (1998). "Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence." J Clin Endocrinol Metab **83**(6): 2012-2017.
- Sutherland L, M. J. (2006). "Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis." Cochrane Database of Systematic Reviews (Online): CD 000543.
- Takeda, K., T. Kaisho, N. Yoshida, J. Takeda, T. Kishimoto and S. Akira (1998). "Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice." J Immunol **161**(9): 4652-4660.
- Tanaka, T. and T. Kishimoto (2012). "Targeting interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases." Int J Biol Sci **8**(9): 1227-1236.
- Tanaka, T., M. Narazaki and T. Kishimoto (2012). "Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor." Annu Rev Pharmacol Toxicol **52**: 199-219.
- Timmer, A., B. Breuer-Katschinski and H. Goebell (1999). "Time trends in the incidence and disease location of Crohn's disease 1980-1995: a prospective analysis in an urban population in Germany." Inflamm Bowel Dis **5**(2): 79-84.
- Timmer, A. and H. Goebell (1999). "Incidence of ulcerative colitis, 1980-1995--a prospective study in an urban population in Germany." Z Gastroenterol **37**(11): 1079-1084.
- Toruner, M., E. V. Loftus, Jr., W. S. Harmsen, A. R. Zinsmeister, R. Orenstein, W. J. Sandborn, J. F. Colombel and L. J. Egan (2008). "Risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease." Gastroenterology **134**(4): 929-936.
- Uronis, J. M., M. Muhlbauer, H. H. Herfarth, T. C. Rubinas, G. S. Jones and C. Jobin (2009). "Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility." PLoS One **4**(6): e6026.
- van der Valk, M. E., M. J. Mangan, M. Leenders, G. Dijkstra, A. A. van Bodegraven, H. H. Fidder, D. J. de Jong, M. Pierik, C. J. van der Woude, M. J. Romberg-Camps, C. H. Clemens, J. M. Jansen, N. Mahmmod, P. C. van de Meeberg, A. E. van der Meulen-de Jong, C. Y. Ponsioen, C. J. Bolwerk, J. R. Vermeijden, P. D. Siersema, M. G. van Oijen, B. Oldenburg, C. s. group, C. the Dutch Initiative on and Colitis (2014). "Healthcare costs of inflammatory bowel disease have shifted from hospitalisation and surgery towards anti-TNFalpha therapy: results from the COIN study." Gut **63**(1): 72-79.
- Van Kemseke, C., J. Belaiche and E. Louis (2000). "Frequently relapsing Crohn's disease is characterized by persistent elevation in interleukin-6 and soluble interleukin-2 receptor serum levels during remission." Int J Colorectal Dis **15**(4): 206-210.
- Van Vollenhoven RF, K. E., Furie R, Blesch A, Wang C, (2009). "Gastrointestinal safety in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab: data from Roche clinical trials." EULAR 2009 Congr., Copenhagen.

- Vind, I., L. Riis, T. Jess, E. Knudsen, N. Pedersen, M. Elkjaer, I. Bak Andersen, V. Wewer, P. Norregaard, F. Moesgaard, F. Bendtsen, P. Munkholm and D. s. group (2006). "Increasing incidences of inflammatory bowel disease and decreasing surgery rates in Copenhagen City and County, 2003-2005: a population-based study from the Danish Crohn colitis database." Am J Gastroenterol **101**(6): 1274-1282.
- Waage, A., P. Brandtzaeg, A. Halstensen, P. Kierulf and T. Espevik (1989). "The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome." J Exp Med **169**(1): 333-338.
- Waetzig, G. H. and S. Rose-John (2012). "Hitting a complex target: an update on interleukin-6 transsignalling." Expert Opin Ther Targets **16**(2): 225-236.
- Waldner, M. J., S. Wirtz, A. Jefremow, M. Warntjen, C. Neufert, R. Atreya, C. Becker, B. Weigmann, M. Vieth, S. Rose-John and M. F. Neurath (2010). "VEGF receptor signaling links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer." J Exp Med **207**(13): 2855-2868.
- Wallenius, V., K. Wallenius, B. Ahren, M. Rudling, H. Carlsten, S. L. Dickson, C. Ohlsson and J. O. Jansson (2002). "Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity." Nat Med **8**(1): 75-79.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo and A. S. Baldwin, Jr. (1996). "TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB." Science **274**(5288): 784-787.
- Wehkamp J., G. M., Herrlinger K., Steurer W., Stange E.F. (2016). "Inflammatory bowel sidease: Crohn's disease and ulcerative colitis." Dtsch Arztebl Int **113**: 72-78.
- Wirtz, S., C. Neufert, B. Weigmann and M. F. Neurath (2007). "Chemically induced mouse models of intestinal inflammation." Nat Protoc **2**(3): 541-546.
- Wu, S., K. J. Rhee, E. Albesiano, S. Rabizadeh, X. Wu, H. R. Yen, D. L. Huso, F. L. Brancati, E. Wick, F. McAllister, F. Housseau, D. M. Pardoll and C. L. Sears (2009). "A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses." Nat Med **15**(9): 1016-1022.
- Xavier, R. J. and D. K. Podolsky (2007). "Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease." Nature **448**(7152): 427-434.
- Yamamoto, K. and S. Rose-John (2012). "Therapeutic blockade of interleukin-6 in chronic inflammatory disease." Clin Pharmacol Ther **91**(4): 574-576.
- Yoshizaki, K., T. Matsuda, N. Nishimoto, T. Kuritani, L. Taeho, K. Aozasa, T. Nakahata, H. Kawai, H. Tagoh, T. Komori and et al. (1989). "Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease." Blood **74**(4): 1360-1367.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen der Forschungsgruppe von Professor Rose-John, dem ich diese Möglichkeit zur Promotion, das Promotionsthema als Teil des gleichlautenden Projektes (dessen Leiter Prof. Rose-John ist) und die freundliche Aufnahme in sein Laborteam verdanke. Darüber hinaus erhielt ich über den gesamten Verlauf der Laborarbeiten stets die Möglichkeit der kritischen Diskussion von aktuellen Zwischenergebnissen und wertvolle Anregungen, die die Gestaltung und den Verlauf dieser Arbeit maßgeblich beeinflusst haben. Abschließend las er die Arbeit wiederholt Korrektur und wies detailliert auf eine Vielzahl notwendiger Verbesserungen hin, wofür ich ihm sehr dankbar bin. Ferner verdanke ich ihm die Aufnahme als externes Mitglied in die IRTG-Förderung, wodurch sich zusätzlich Möglichkeiten zur Präsentation und Diskussion von vorläufigen Zwischenergebnissen boten.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinem operativen Mentor, Fr. Dr. Spehlmann, die mich nicht nur mit großer Geduld in handwerklichen Labortechniken und -methoden ausbildete, sondern auch im Rahmen der Ergebniskontrolle die Bewertung der Histologie überprüfte.

Dank auch an Fr. Dr. Chalaris und Prof. Dr. Rabe, die mich in der Zeit klinisch bedingter Abwesenheit von Dr. Spehlmann in der Laborarbeit sowie durch zahlreiche Anregungen unterstützten.

Daneben bedanke ich mich auch bei den Mitgliedern des Viktor-Hensen-Hauses der CAU, die mich im Rahmen der Tierversuche stets unterstützten und im Rahmen des AOM-Versuchs bei Injektionen auch assistierten.

Ferner bedanke ich mich bei Dr. Wahl von BD Biosciences Pharmingen für die Einführung in die Durchflusszytometrie und die intensive Beratung zur Vorgehensweise bei der Datenanalyse.

Dank auch an Konrad Aden vom Institut für klinische Molekularbiologie der CAU Kiel, der die Koloskopie der Versuchstiere im Rahmen der Versuchsreihe DSS-AOM-1 durchführte.

Tabellarischer Lebenslauf

Name: Dr. Michael Badke
Geburtsdatum: 02.01.1964
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder
Nationalität: deutsch

Ausbildung:

1970-1983 Grundschole und Gymnasium in Bonn
1983-1987 Universität Bonn: Studium der Volkswirtschaftslehre
1987-1990 Promotion im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 303 der Deutschen Forschungsgemeinschaft
2008-2015 Universität Kiel (CAU): Studium der Medizin
2011 1. Staatsexamen Medizin
2014 2. Staatsexamen Medizin
2015 3. Staatsexamen Medizin
2011-2018 Promotion am Biochemischen Institut der Universität Kiel
2011-2013 Mitglied der Integrated Research Training Group (ITRG) des Sonderforschungsbereich der Deutschen Forschungsgemeinschaft 877
2014-2015 Praktisches Jahr: 1. Terial: Innere Medizin (CAU-Kiel)
2. Terial: Chirurgie (Städtisches Krankenhaus Kiel)
3. Terial: Urologie (LMU München)

Berufstätigkeit:

1990-1995 McKinsey & Company: (Associate bzw. Engagement Manager)
1095-1998 LG-Electronics: (Vertriebs- und Marketingdirektor Deutschland)
1998-2001 Quelle-Konzern: (Senior Productmanager)
2001-2003 Quelle-Konzern: (Vorstand)
2003-2005 Neckermann Versand AG (Vorstand)
2002-2004 Konzerneinkauf Karstadt-Quelle (KQKE) (Geschäftsführer)
2005-2006 Quelle-Konzern (Sprecher der Geschäftsführung)
2006- Unternehmensberatung Badke & Partner
2015-2016 Arzt in Weiterbildung (Klinikum Ingolstadt)
2016-2017 Arzt in Weiterbildung (Klinikum St. Irmingard)
2018- Arzt in Weiterbildung (Nordseeklinikum Westfalen)



München, den 04.05.2018

Dr. Michael Badke