

Purinerge und cholinerge Aktivierung enterischer Gliazellen im entzündlichen Geschehen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Anna Miesen

aus Simmerath

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sven Wehner
2. Gutachterin: PD Dr. Stilla Maria Frede

Tag der Mündlichen Prüfung: 21.08.2024

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Jörg C. Kalff

Für meine Lieben

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	8
1.	Einleitung	10
1.1	Die enterische Gliazelle	10
1.1.1	Die Gliazelle innerhalb des enterischen Nervensystems	10
1.1.2	Geschichte und Systematik der EGZ	10
1.1.3	Funktion der EGZ	13
1.1.4	Immunreaktivität der EGZ (enterische Gliose)	14
1.2	Die intestinale epitheliale Barriere	17
1.3	IL-6 als proinflammatorisches Zytokin	18
1.4	Rezeptoren als Mediatoren inflammatorischer Vorgänge	20
1.4.1	Die purinergen Signalwege	21
1.4.2	Der cholinerge Signalweg	24
1.5	Die EGZ als mögliche therapeutische Zielstruktur	25
1.6	Zielsetzung	26
2.	Material und Methoden	28
2.1	Material	28
2.1.1	Tiere	28
2.1.2	Verwendete Chemikalien	28
2.2	Methoden	28
2.2.1	Gliazell-Isolation	28
2.2.2	Zellkontrolle	30
2.2.3	Gliazell-Split	30
2.2.4	Allgemeiner Versuchsaufbau	31
2.2.4.1	IL-6-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (IL-6-ELISA)	32
2.2.4.2	Versuchsreihen	32
2.2.5	Immunhistochemie	33
2.2.5.1	IHC der Zellkultur	33
2.2.5.2	Muscularis-externa-Präparate	34
2.2.6.1	IL-6-Knock-Out-Versuchsreihe	34

2.2.6.2	IL-1 β -Stimulation	35
2.2.6.3	ATP/UTPyS-Stimulation	35
2.2.6.4	P2-Rezeptor-Versuchsreihe	35
2.2.6.5	P2X ₇ -Rezeptor-Versuchsreihe	35
2.2.6.6	Adenosin-Rezeptor-Versuchsreihe	35
2.2.6.7	Acetylcholin-Rezeptor-Versuchsreihe	36
2.2.7	Statistische Datenanalysen	36
3.	Ergebnisse	37
3.1	Immunhistochemie	37
3.1.1	Die kultivierten EGZ exprimieren GFAP	37
3.1.2	Die EGZ sind prozentual der häufigste vorliegende Zelltyp in der Zellkultur	38
3.2	Reproduzierbare IL-6-Sekretion nach IL-1 β -Stimulation	39
3.3	Effekt von Acetylcholin auf die EGZ	40
3.3.1	Acetylcholin hat keinen Effekt auf die IL-6-Sekretion	40
3.4	Auswirkungen der Nukleotide auf EGZ	41
3.4.1	ATP steigert die IL-6-Sekretion in EGZ	41
3.4.2	Nach Stimulation mit ATP ist ein IL-6-Signal immunhistochemisch detektierbar	45
3.5	Effekt von purinergen Rezeptorantagonisten	46
3.5.1	Die ATP-vermittelte IL-6-Sekretion erfolgt über die P2-Rezeptoren	46
3.5.2	P2X ₇ -Rezeptor-Antagonisten hemmen die IL-6-Sekretion nicht	49
3.6	Effekt von Adenosin-Rezeptor-Agonisten	50
3.6.1	Die Stimulation des A _{2A} -Rezeptors senkt die IL-6-Sekretion	50
3.6.2	Die Stimulation des A ₃ -Rezeptors erhöht die ATP-vermittelte IL-6-Sekretion	51
4.	Diskussion	53
4.1	Schwankungen in der Zellkultur	54
4.2	Purinerge Aktivität bei inflammatorischen Vorgängen	55
4.2.1	Proinflammatorischer Effekt	55
4.2.2	Antiinflammatorischer Effekt	57
4.3	Cholinerge Aktivität bei inflammatorischen Vorgängen	59
4.4	Ausblick: die EGZ als möglicher Regulator intestinaler Entzündungsvorgänge	61
5.	Zusammenfassung	62

6.	Abbildungsverzeichnis	64
7.	Literaturverzeichnis	65
8.	Danksagung	85

Abkürzungsverzeichnis

ABM	Astrocyte basal medium
(m/n)ACh(R)	(muskarinerner/nikotinerger)Acetylcholin(-Rezeptor)
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bcl	B-cell lymphoma
Bl6	Black-6-Maus
BSA	Bovine Serum Albumin
CD (4/31)	Cluster of Differentiation (4/31)
CED	Chronisch-Entzündliche Darmerkrankung(en)
Ctrl	Vehicle/Kontrolle
CU	Colitis Ulcerosa
DAMP	damage-associated molecular pattern
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture
EGZ	Enterische Gliazelle(n)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENS	Enterisches Nervensystem
GDNF	Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GNSO	S-Nitroso-L-Glutathione
gp130	Glykoprotein 130
IL(-6/1 β , u.a.)	Interleukin
IFN	Interferon
KHB	Krebs-Henseleit-Puffer
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chemotactine Protein 1
MC	Morbus Crohn
ME	Muscularis externa

MIP	Makrophage-inflammatory-protein
NO	Nitric Oxide
NT-3	Neurotrophin-3
NTPDase	Nukleosidtriphosphodiphosphohydrolase
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PEA	Palmitoylethanolamid
PLP-1	Proteolipid-Protein 1
PNS	Peripheres Nervensystem
POI	Postoperativer Ileus
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
rpm	Umdrehungen pro Minute
sIL-6R	löslicher IL-6-Rezeptor
SMA	Smooth Muscle Actin
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UDP	Uridindiphosphat
UTP (gS)	Uridintriphosphat (gamma trisodium)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Die enterische Gliazelle

1.1.1 Die Gliazelle innerhalb des enterischen Nervensystems

Das enterische Nervensystem (ENS) ist ein Geflecht aus Neuronen und Gliazellen, den sogenannten enterischen Gliazellen (EGZ), das in zwei Hauptplexus, dem Plexus myentericus und dem Plexus submucosus organisiert ist (Gabella, 1981; Boesmans et al., 2015; Sharkey, 2015). Diese Plexus liegen intramural als Geflecht vor. Der Plexus myentericus, auch Auerbach-Plexus genannt, besteht aus einem Gangliengeflecht und liegt in der Tunica muscularis zwischen der longitudinalen und der zirkulären Muskulatur. Er ist für die Steuerung der Darmmotilität, die Peristaltik, und für sekretomotorische Funktionen des Darms, wie die Sekretion von Enzymen zuständig. Der Plexus submucosus gliedert sich in den Plexus submucosus internus, auch Meissner Plexus genannt, und externus, Schabadasch Plexus genannt. Auch diese Plexus bestehen aus Gangliengeflechten. Der Plexus submucosus befindet sich in der Submukosa zwischen der Tunica mucosa und der Tunica muscularis. Er steuert ebenfalls durch Koordination der Feinmotilität des Darms die Peristaltik und ist zudem für die Regulation der Drüsenfunktion zuständig (Baumgarten, 1982; Rao und Wang, 2010; Hansen, 2003a). Außerhalb der Plexus befinden sich auch in den anderen Wandschichten des Darms Netzwerke von Neuronen und sogenannten extraganglionären EGZ. In ihrer Gesamtheit bilden diese Netzwerke das ENS. Dieses agiert entweder autonom vom zentralen Nervensystem (ZNS) oder in Koordination mit dem vegetativen Nervensystem, dem Sympathikus und dem Parasympathikus (Gershon, 1999; Furness, 2007; Carabotti et al., 2015). Insgesamt steuert das ENS so unter anderem die Motilität, die Verdauung und Resorption von Nährstoffen, sowie die Durchblutung, jedoch auch immunologische Prozesse (Furness, 2012; Yoo und Mazmanian, 2017). Die Rolle der EGZ in diesen immunologischen Prozessen war lange unklar, rückte jedoch in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus derzeitiger Forschungen und ist das zentrale Thema dieser Arbeit.

1.1.2 Geschichte und Systematik der EGZ

Erstmals beschrieben wurde die EGZ 1899 von Dogiel et al. (Dogiel, 1899). Den Namen bekam die Gliazelle aus der griechischen Sprache (γλοία), was übersetzt

„Kleber“ bedeutet. Zugeordnet wurde sie den Schwannzellen, eine Form der Gliazellen die im peripheren Nervensystem (PNS) die Myelinscheiden der Neurone bilden und so für Schutz aber auch für die Beschleunigung der Reizweiterleitung sorgen (Mirsky und Jessen, 1999; Salzer, 2015).

Die EGZ liegen intramural in allen Schichten der Darmwand als extraganglionäre oder intraganglionäre Zellen vor. Vor allem in den Ganglien der glatten Muskulatur aber auch in der Lamina propria mucosae befinden sie EGZ in enger räumlicher Nähe zu Neuronen. In ihrer Anzahl unterscheiden sie sich von den Neuronen, wobei der sogenannte Glia-Index („glia-to-neuron-ratio“) von unterschiedlichen Faktoren wie Lokalisation im Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt), Alter, Geschlecht und Spezies abhängig ist: So ist er beispielsweise beim Menschen etwa 7-mal höher als bei der Maus (Grubišić und Gulbransen, 2017; Hoff et al., 2008). 1972 entdeckte schließlich Giorgio Gabella, dass die EGZ eine eigene charakteristische Identität aufweist, was sie von anderen Gliatypen im peripheren Nervensystem unterscheidet (Gabella, 1972). Diese Feststellung stützte sich zunächst noch auf die Morphologie, welche sich grundlegend von der der Schwannzellen unterscheidet. Die EGZ wird als eine kleine Zelle mit geringer Zytoplasmamenge und langen Ausläufern mit sogenannten „*End-feet*“ beschrieben. Es werden 4 Subklassen von EGZ unterschieden, je nach Morphologie und Lokalisation (Gabella, 1981; Boesmans et al., 2015). Klasse I-Gliazellen sind sternförmig und hauptsächlich in den Ganglien zu finden. Die zweite Klasse ist typisch elongiert und interganglionär lokalisiert (Hanani und Reichenbach, 1994). Klasse III- und IV-Gliazellen befinden sich in der Mukosa bzw. intramuskulär. Die genaue Funktion der jeweiligen Unterklassen ist teils noch unklar (Gulbransen und Sharkey, 2012; Rühl, 2005). Allerdings konnte diese Einteilung mittlerweile erweitert und ergänzt werden und die Funktionen der jeweiligen Typen der EGZ näher beschrieben werden. Hierauf werde ich im Kapitel 1.1.3 näher eingehen.

Neben der Morphologie unterscheidet sich auch die Lage der EGZ von der der Schwannzellen. So bedeckt die EGZ das Neuron im Gegensatz zur Schwannzelle nicht vollständig, schirmt es dadurch nicht gänzlich von schädigenden Einflüssen von außen ab und kann dadurch auch keinen vollkommenen Schutz gegen schädigende Faktoren bieten (Gershon und Rothman, 1991; Neunlist et al., 2014).

Aufgrund dieser Unterschiede zog man schließlich den Vergleich zu den ZNS-ständigen Astrozyten, die sich in vielen Einzelheiten sowie morphologisch ähneln (Jessen und

Mirsky, 1983; Rühl et al., 2004). So gibt es auch auf molekularer Ebene Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Zelltypen. Die EGZ exprimieren ebenfalls das Intermediärfilament „Glial fibrillary acidic protein“, kurz GFAP, (Jessen und Mirsky, 1980; Coelho-Aguiar et al., 2015) und das Kalzium-bindende Protein S100B (Ferri et al., 1982; Sharkey, 2015), welche sich mittlerweile auch als histologische Marker etabliert haben. Weitere Marker, die im Verlauf detektiert werden konnten sind Proteolipid-protein-1 (PLP-1) und der Transkriptionsfaktor Sox10 (Seguella und Gulbransen, 2021; Drokhlyansky et al., 2020). Ihre Rolle ist dabei nicht nur auf die histopathologische Detektion beschränkt. GFAP beispielsweise wird je nach Subtyp, Aktivität und Antikörper von der EGZ exprimiert (Boesmans et al., 2015; Schneider et al., 2022), worauf ich in folgenden Kapiteln noch näher eingehen werden.

S100B reagiert auf Kalziumsignale und spielt hierüber eine wichtige Rolle im Energiehaushalt der Zelle, sowie bei der Transkription bestimmter Gene, dem Proteinmetabolismus und der Zellproliferation und -differenzierung (Sorci et al., 2013; Boesmans et al., 2015; Grundmann et al., 2019).

Der Marker PLP-1 wird vor allem von Typ-IV-Gliazellen exprimiert, die kein GFAP exprimieren (Rao et al., 2015). Tierversuche legten nahe, dass PLP-1-exprimierende EGZ nach einer Diphtherietoxin-induzierten Entzündung der Muscularis die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen stimulieren (Stakenborg et al., 2022).

Der Transkriptionsfaktor Sox10 ist ein spezifischer Marker für die Progenitorzellen der EGZ und ist beteiligt an der Differenzierung oder auch Gliogenese dieser Zellen (Kim et al., 2003; Liu und Yang, 2022).

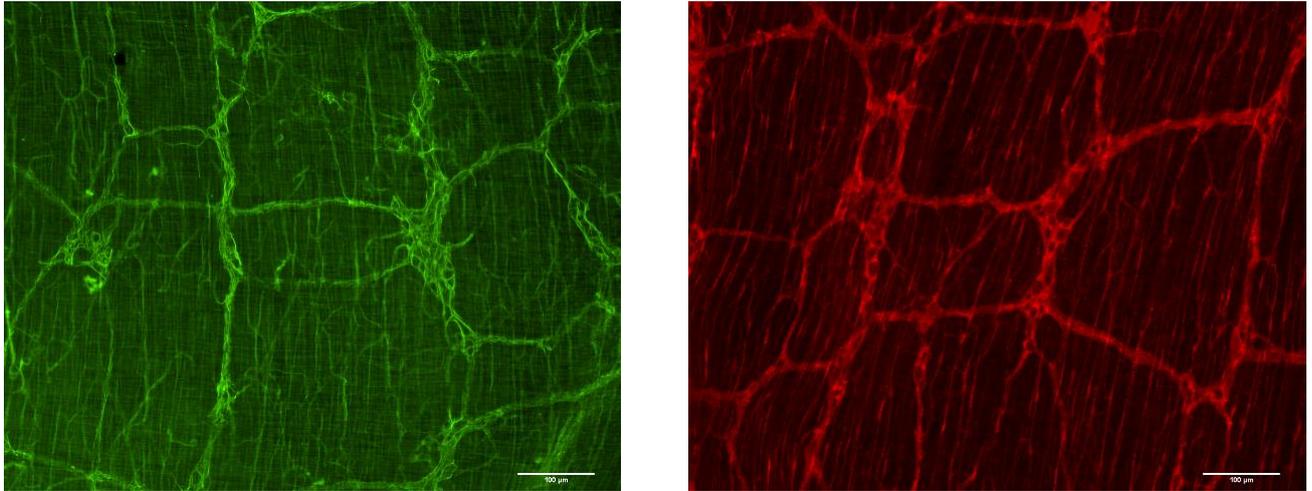


Abb. 1: „Whole-mount“-Präparate

Immunhistochemische Färbung von EGZ in „whole-mount“-Präparaten der Tunica muscularis des Ileums einer Maus mit anti-GFAP- (grün) bzw. anti-S100B-Antikörpern (Rot). Skala = 100 µm

1.1.3 Funktion der EGZ

„Glia“ war nicht nur der Name, sondern beschrieb auch die Funktion, die man der EGZ anfänglich zusprach. Es wurde angenommen, dass die EGZ vor allem für die strukturelle Unterstützung der Neuronen zuständig ist. Tatsächlich haben die EGZ noch eine Reihe anderer Aufgaben, zu denen sich immer wieder neue Funktionen hinzugesellt haben.

Dabei können die vielseitigen Funktionen der EGZ mittlerweile teils auch den Subtypen (Typ I-IV, siehe **Kap. 1.1.2**) zugeordnet werden, wobei die genauen Funktionen der EGZ im Detail noch nicht gänzlich geklärt sind. Typ I der EGZ, die im myenterischen Plexus liegen, umgeben neuronale Zellkörper und sind für verschiedene Funktionen wie unter anderem die Regulierung neuronaler Aktivität, Neuroinflammation und oxidativem Stress sowie der Immunregulation zuständig (Seguella und Gulbransen, 2021). Typ I der EGZ, die im submukösen Plexus liegen, steuern vor allem sekretomotorische Funktionen von Neuronen (Fung et al., 2017). Typ II der EGZ, die interganglionär lokalisiert werden, sind für die Signalweiterleitung innerhalb des glialen Netzwerkes zuständig (Gulbransen und Sharkey, 2009). Die Funktion von Typ III und IV der EGZ konnte bisher noch nicht sicher eruiert werden (Seguella und Gulbransen, 2021).

Die Kommunikation mit den Neuronen basiert größtenteils auf Kalzium-Signalen, die in

den EGZ durch neuronale Signale erzeugt werden (Grubišić und Gulbransen, 2017). Es konnte zudem gezeigt werden, dass nach elektrischer Stimulation von Neuronen freier ATP an EGZ bindet, was zu einer Aktivierung der Zelle im Sinne einer erhöhten Kalzium-Konzentration führt (Gulbransen und Sharkey, 2009). Außerdem zeigte sich, dass dieses Kalziumsignal auch an umliegende Zellen über Gap-junctions weitergegeben wird (Zhang et al., 2003). Die EGZ nimmt also eine aktive Rolle in der neuronalen Kommunikation ein.

Da die ihnen so ähnlichen Astrozyten durch Interaktion mit Endothelzellen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke innehaben (Abbott et al., 2006), entstand die Hypothese, dass auch die EGZ ähnliche Funktionen besitzen könnten. Tatsächlich stehen die EGZ über ihre Endfüße in direktem Kontakt zu der Basalmembran des enterischen Epithels und beeinflussen dessen Proliferation und Adhäsion (van Landeghem et al., 2009). Eine Ablation der EGZ führte nach chemischen Verletzungen des Darmepithels zu einer verzögerten Wundheilung (van Landeghem et al., 2011). Es zeigte sich außerdem, dass ein Fehlen der EGZ ohne Verletzungen der Darmwand schon eine erhöhte Permeabilität des enterischen Epithels, sowie erhöhte Sekretion proinflammatorischer Zytokine zur Folge hat. Mäuse, denen durch genetische Veränderung die EGZ fehlten, erlitten fulminante Jejunoileitiden und Nekrosen (Bush et al., 1998). Auch eine autoimmune Ablation der Zellen führte zu fulminanten Enterokolitiden (Cornet et al., 2001; Aubé et al., 2006). Die EGZ sind somit wesentlicher Bestandteil der Darmbarriere. Durch diese Untersuchungen erlangte die EGZ einen neuen Stellenwert in der heutigen Forschung. Insbesondere ihre Funktion in der Regulation der intestinalen Barriere sowie eine weitere wichtige Funktion, die immunregulatorische Funktion, stehen dabei im Vordergrund. Hierauf werde ich im Folgenden näher eingehen.

1.1.4 Immunreaktivität der EGZ (enterische Gliose)

Neben der morphologischen Unterscheidung der EGZ untereinander entstand im Verlauf die These einer Form der „aktivierten Gliazelle“ nach bestimmten proinflammatorischen Stimuli (Rosenbaum et al., 2016; Brown et al., 2016; Stoffels et al., 2014).

Genanalysen zeigten Parallelen zwischen der Genexpression reaktiver EGZ und der Genexpression, welche bei einer Gliose im ZNS durch reaktive Astrozyten beobachtet

wurde (Escartin et al., 2019). Auch hier zeigte sich eine vermehrte Expression von wichtigen Genen der Immunantwort, wie sie bei der Gliose aktivierter Astrozyten ebenfalls gesehen wurde (Zamanian et al., 2012; Fujita et al., 2018; Rakers et al., 2019). Dabei konnte nach Stimulation muriner EGZ mit Adenosintriphosphat (ATP) eine erhöhte Expression inflammatorischer Stoffe wie Cxcl-2 und Interleukin-6 (IL-6) sowie der typischen Gliose-Marker GFAP und Nestin als Zeichen einer reaktiven EGZ gemessen werden (Schneider et al., 2021). Ein vergleichbares Ergebnis erzielte die Stimulation kultivierter EGZ mit Interleukin-1 β (IL-1 β), einem essentiellen Zytokin in der Entwicklung des postoperativen Ileus (Stoffels et al., 2014). Es zeigte sich eine Stimulation bestimmter Zytokine wie IL-6 und M-CSF, Chemokine wie Cxcl-2 sowie Änderungen in der Morphologie der EGZ (Schneider et al., 2022). Dabei variierte die Geneexpression der Zytokine und Chemokine der reaktiven EGZ nach ATP-Stimulation von der nach der IL-1 β -Stimulation, was wiederum impliziert, dass der Aktivierungsstatus der EGZ und die „enterische Gliose“ vom jeweiligen Stimulus abhängen. Unklar bleibt, ob es auch gemeinsame Aktivierungssignaturen der EGZ in unterschiedlichen Krankheitsmodellen gibt. Aktuelle nicht publizierte Studien unserer Arbeitsgruppe befassen sich mit dieser Fragestellung.

Die „aktivierte EGZ“ wurde schon zuvor beschrieben, wobei man sich seinerzeit vor allem auf eine vermehrte GFAP-Expression als Zeichen einer Gliose fokussierte. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Stimulation kultivierter EGZ mit Lipopolysacchariden (LPS) als Trigger einer systemischen Immunreaktion, einem Bestandteil der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien, eine massive Aktivierung der EGZ-Subpopulation, die GFAP exprimiert, initiiert (Rosenbaum et al., 2016). Diese GFAP-positiven EGZ waren nach Stimulation mit LPS für die Sekretion verschiedener Zytokine verantwortlich.

GFAP ist ein Intermediärfilament-III-Protein, welches in Astrozyten des ZNS, in nicht-myelinisierenden Schwannzellen und den EGZ, vor allem in intraganglionären EGZ vorkommt (Jessen et al., 1984; Boesmans et al., 2015). Zum Zeitpunkt der Entstehung der Arbeit war GFAP der gängige Marker der EGZ. Im Verlauf entwickelte er sich zudem zum Marker der „aktivierten EGZ“. Grob ließen sich initial zwei Gruppen von EGZ anhand der GFAP-Expression unterscheiden, die Zellen, die eine detektierbare Menge an GFAP exprimieren und die, die dies nicht tun, allerdings in der Lage sind nach bestimmten

Stimuli die Expression auf eine messbare Menge zu erhöhen (Boyen, GBT von et al., 2004). Mittlerweile haben sich bereits weitere Marker etabliert (siehe **Kap. 1.1.2**), wobei GFAP ein zentraler Marker der aktivierten Gliazelle geblieben ist.

Im klinischen Zusammenhang zeigt sich dieser Effekt auch bei den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED). GFAP ist beispielsweise bei Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) deutlich erhöht. Ebenso bei Patienten mit infektiöser Kolitis (Boyen et al., 2011). Auf den klinischen und immunologischen Zusammenhang der „aktivierten Gliazelle“ werde ich im Folgenden näher eingehen.

Die zentrale Rolle der EGZ an immunmodulatorischen Prozessen ist mittlerweile nicht mehr umstritten. So sind die EGZ unter anderem Antigen-präsentierende Zellen (Hollenbach et al., 2000) und produzieren selbst Substanz P, was unter anderem zu einer Degranulation von Mastzellen und zu einer proinflammatorischen Aktivität von Makrophagen führt (Cabarrocas et al., 2003). Nach bestimmten Stimuli wie beispielsweise ATP sezernieren sie Gewebe-protective Moleküle wie Neurotrophin-3 (NT-3), GDNF und GNSO aber auch destruktive, proinflammatorische Mediatoren wie IL-1 β , IL-6, TNF α , Stickstoffmonoxid (NO) und Chemokine (Rühl et al., 2001; Yu und Li, 2014; Ochoa-Cortes et al., 2016). In der Literatur wird bereits seit einigen Jahren diskutiert, ob Veränderungen der EGZ, wie sie oben am Beispiel der „aktivierten EGZ“ beschrieben werden, verantwortlich für Darmerkrankungen sind. Wie bereits beschrieben ist GFAP bei Patienten mit CU oder infektiöser Kolitis deutlich erhöht (Boyen et al., 2011). Dagegen ist das Intermediärfilament bei Patienten mit Morbus Crohn (MC) und mit Divertikulitis signifikant erniedrigt (Neunlist et al., 2014).

Zusätzlich zeigten Studien, dass ein gezieltes Ausschalten von GFAP-exprimierenden EGZ zu einer Schädigung der intestinalen epithelialen Barriere und zu einer fehlenden Regeneration der epithelialen Zellen nach Schädigung führten (Aubé et al., 2006; Savidge et al., 2007; Neunlist et al., 2007). Der protective Einfluss der EGZ auf die intestinale epitheliale Barriere bei Verletzungen des Darmepithels wird nach neuesten Studien über WNT-Liganden vermittelt, die von EGZ exprimiert werden und zur Proliferation Lgr5⁺-epithelialen intestinalen Stammzellen führt (Baghdadi et al., 2022).

Eine weitere akute intestinale Erkrankung, der sogenannte postoperative Ileus (POI), basiert ebenfalls auf einer akuten Immunantwort der Darmwand. Auch hier sind die EGZ maßgeblich beteiligt. Im Mausmodell zeigte sich dabei eine Abhängigkeit des IL-1-

Rezeptor Type 1, der auf EGZ exprimiert wird und durch dessen Aktivierung im Rahmen des POI IL-6 und Chemokine wie MCP-1 freigesetzt werden, welche beide eine wichtige Rolle im POI übernehmen (Wehner et al., 2005; Stoffels et al., 2014; Giovanna Farro et al., 2017).

Zusammenfassend deuten eine Vielzahl von Studien auf verschiedene wichtige, teils gegensätzliche Funktionen der EGZ hin. Einerseits halten sie die Schutzbarriere des Darms aufrecht und fördern die Wundheilung des Epithels, andererseits tragen sie in gewissen Situationen auch zur Aufrechterhaltung pathologischer Vorgänge bei. Das unterschiedliche Genexpressionsmuster der EGZ innerhalb verschiedener CED unterstreicht diese konträren Funktionen, wobei unklar ist, ob diese Unterschiede Folge oder Ursache der Erkrankungen sind. Gegenstand jetziger Forschungen ist deswegen die genaue Funktion der EGZ besser zu verstehen, um zukünftig möglichst gezielte Therapien bei gastrointestinalen Erkrankungen zu entwickeln.

1.2 Die intestinale epitheliale Barriere

Die intestinale epitheliale Barriere schützt den Organismus vor der Umwelt. Sie ist dauerhaft mit schädigenden Stoffen und Erregern konfrontiert. Sie ist aufgebaut aus dem Mikrobiom, der Mukusschicht, die den Lebensraum des Mikrobioms darstellt und antimikrobielle Stoffe enthält, und den Epithelzellen, die mit den tiefer liegenden Mukosazellen vor allem eine mechanische Barriere darstellen (Vancamelbeke und Vermeire, 2017). Zwischen den Epithelzellen sorgen Tight junctions für eine zuverlässigere Undurchlässigkeit der Darmschleimhaut. In der Darmschleimhaut sind zusätzlich zahlreiche Immunzellen wie Leukozyten enthalten, die unter anderem über die Epithelzellen aktiviert werden können. Detektieren die Epithelzellen Pathogene, sind sie in der Lage das Immunsystem des Darms zu aktivieren (Saldana-Morales et al., 2021; Allaire et al., 2018). Das lymphatische Gewebe des Darms liegt in der Lamina propria und besteht aus einzelnen Immunzellen, Lymphfollikeln oder auch Follikelaggregaten wie den Peyer-Plaques. Aber auch im Epithel sind lymphatische Zellen wie die dendritischen Zellen zu finden (Mowat und Agace, 2014). Eine intestinale Entzündung kann viele verschiedene Ursachen haben. Neben chemischen oder physikalischen Noxen sind vor allem häufig Bakterien verantwortlich für Schäden des Darmepithels. Sie überwinden die Darmbarriere, teils durch die Fähigkeit der Toxin-Bildung wie z.B. bei den pathogenen

Escherichia-coli-Stämmen, teils auch durch eine schon bestehende Schädigung der Darmbarriere (Kaper et al., 2004). Folgen können unter anderem Schmerzen, Stuhlunregelmäßigkeiten wie blutige oder wässrige Diarrhöen, Fieber und bei fehlender Regeneration auch Chronifizierung und Malabsorption sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die EGZ in der Lage sind zwischen pathogenen und probiotischen Bakterien zu unterscheiden, da es nur nach Kontakt zu pathogenen Bakterien zu einer erhöhten Expression von NO, einem wichtigen Signalmolekül inflammatorischer Vorgänge im Körper, kam (Turco et al., 2014). Zusätzlich spielen die EGZ, wie im Kapitel 1.1.5 bereits beschrieben, eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung dieser intestinalen epithelialen Barriere.

Entzündungsvorgänge, die die intestinale epitheliale Barriere stören können, ausgelöst durch das Immunsystem, sind eigentlich Protektionsmechanismen des Organismus, um die zelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten und das Pathogen zu eliminieren (Medzhitov, 2008; Ahmed, 2011; Serhan und Savill, 2005). Bei Patienten mit entzündliche Darmerkrankungen besteht häufig ein Defekt in der Darmbarriere, der eine starke und überschießende Immunantwort zur Folge hat (McGuckin et al., 2009). Langfristig besteht eine Dysbalance innerhalb der Immunregulation. Ob dieser Defekt Grund oder Folge der Erkrankungen ist, wird zurzeit diskutiert. Allerdings sind die EGZ als wichtiger Bestandteil der Aufrechterhaltung der intestinalen epithelialen Barriere ein zentraler Faktor in der Entwicklung möglicher gezielter Therapien.

1.3 IL-6 als proinflammatorisches Zytokin

Man unterscheidet die angeborene Immunabwehr, die neben physikalischen, chemischen und biologischen vor allem zelluläre und humorale Mechanismen beinhaltet, von der erworbenen Immunabwehr, die grob durch drei Subtypen der T-Zellen repräsentiert wird (Iwasaki und Medzhitov, 2015). Zu den humoralen Mechanismen gehören die Plasmaproteine, die auf Erreger reagieren und weitere Schritte der Immunantwort initiieren. Plasmaproteine umfassen die Akute-Phase-Proteine, die vor allem die Wundheilung fördern und das unspezifische Immunsystem unterstützen, die Faktoren des Komplementsystems, die Bakterien lysieren und weitere Immunzellen aktivieren, und die proinflammatorischen Zytokine (Chaplin, 2010; Nicholson, 2016).

Zytokine sind hormonähnliche Polypeptide, die meist para- oder autokrin von vielen

verschiedenen Zellen sezerniert werden. Eine ihrer vielfältigen Funktionen ist die Aktivierung verschiedener Immunzellen und die Vermittlung der Kommunikation zwischen diesen (Zhang und An, 2007). Eine Unterfamilie der Zytokine sind die Interleukine, zu denen auch IL-6 gehört, welches diese Arbeit hauptsächlich als Marker für die Aktivierung der EGZ nutzt.

IL-6 ist ein klassisches proinflammatorisches Zytokin mit weitreichenden, pleiotropen Eigenschaften, das von einer großen Anzahl unterschiedlicher Zellen, wie beispielsweise T- und B-Zellen, Monozyten oder Makrophagen sezerniert wird. Zielstruktur dieses Zytokins sind andere Zellen und auch Stoffe, wie die Akute-Phase-Proteine (Naka et al., 2002; Hirano, 2021). Bei gewissen Immunzellen und auch beispielsweise bei Hepatozyten bindet IL-6 über einen membranständigen Rezeptor. Zusätzlich bindet es an einen löslichen Rezeptor, den sIL-6R, der mit dem Membranglykoprotein gp130, welches auf nahezu allen Körperzellen vorhanden ist, in der Zielzelle interagiert (Mudter und Neurath, 2007). gp130 bildet mit dem Zytokin-Rezeptor-Komplex IL-6/IL-6R einen größeren Komplex und agiert als Signaltransduktor in der Zelle (Hibi et al., 1990). Die Funktionen von IL-6 sind vielfältig, insbesondere ist die Rolle dieses Zytokins in der Entwicklung von chronischen Entzündungen zu nennen. Über gp130 induziert es in CD4⁺-T-Zellen den Transkriptionsfaktor STAT-3, der wiederum antiapoptotische Faktoren der bcl-Familie aktiviert, was u.a. bei den CED beobachtet werden konnte (Mudter und Neurath, 2007; Hirano, 2021). Bei Patienten mit CU wurden zudem auch erhöhte IL-6-Serum-Level gemessen, die mit der Krankheitsaktivität korrelierten (Suzuki et al., 1990; Umehara et al., 2006; Pawłowska-Kamieniak et al., 2021).

Rühl et al. erforschten 2001 die Verbindung von IL-6 mit den EGZ in Rattenzellen und fanden heraus, dass EGZ in der Lage sind das Zytokin zu produzieren und sogar auf bestimmte Stimulationen mit IL-1 β mit einer erhöhten Expression von IL-6 zu reagieren (Rühl et al., 2001). Dabei konnte die maximale Konzentration nach ca. 24 Stunden gemessen werden.

Stoffels et al. konnten dies 2014 im Mausmodell bestätigen und zudem noch die essentielle Verknüpfung der IL-6-Expression in EGZ mit der Entwicklung eines POI herstellen (Stoffels et al., 2014; Wehner et al., 2005). Es wurde beobachtet, dass nach künstlicher Induktion eines POI durch mechanische Manipulation am Darm ein starker IL-6-Anstieg zu messen war. Zudem konnte gezeigt werden, dass die EGZ nach Stimulation

des IL-1 β -Rezeptors unter anderem IL-6 sezernieren. Dieser IL-1 β -Rezeptor wurde als zentraler Rezeptor in der Pathogenese des POI detektiert. IL-1 β -R-defiziente Mäuse zeigten einen signifikant erhöhten gastrointestinalen Transit im Vergleich zum Wildtyp nach mechanischer Manipulation des Darms. Zudem kam es nicht zu einem zuvor im Wildtyp detektierten Anstieg des Zytokins IL-6. Als Folge blieben die entzündlichen Vorgänge in der Muscularis externa mit nachfolgenden Motilitätsstörungen aus.

Im Rahmen des bereits oben beschriebenen Status der „aktivierten Gliazelle“ konnten ebenfalls erhöhte IL-6-Level gemessen werden (Schneider et al., 2022).

Aufgrund dieser Zusammenhänge konzentriert sich diese Arbeit auf das Zytokin IL-6 als Marker der proinflammatorischen Aktivität der EGZ.

1.4 Rezeptoren als Mediatoren inflammatorischer Vorgänge

Der GI-Trakt wird neben dem ENS, dem die EGZ zugehören, zusätzlich durch Nerven des PNS, vor allem des autonomen Nervensystems, bestehend aus dem Sympathikus und dem Parasympathikus (z.B. dem Nervus Vagus), die in direktem Kontakt zum ENS stehen und dieses steuern können, innerviert (Yoo und Mazmanian, 2017). So besteht eine autonome Funktion einerseits aber auch eine vom ZNS-abhängige Funktion des ENS (Furness und Costa, 1980). Die wichtigsten Neurotransmitter des autonomen Nervensystems sind die Katecholamine der sympathischen Nerven und Acetylcholin (ACh) als Transmitter des Parasympathikus. Beide spielen eine wichtige und oft gegensätzliche Rolle in verschiedenen Funktionen des GI-Traktes und sind auch an immunmodulatorischen Vorgängen beteiligt (Goverse et al., 2016; Straub et al., 2006), auf die in den folgenden Kapiteln näher eingegangen wird.

Kotransmitter sympathischer Nerven ist beispielsweise ATP, das zusätzlich zu den sogenannten Damage Associated Molecular Pattern (DAMP) gehört und als solches nach Verletzungsvorgängen inflammatorische Prozesse auslösen kann (Di Virgilio et al., 2020).

In unterschiedlichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die EGZ Rezeptoren für die Neurotransmitter ATP und seine Abbauprodukte, sogenannte purinerge Rezeptoren sowie für ACh, die nikotinerge und muskarinerge Rezeptoren, exprimieren (Delvalle et al., 2018; Schneider et al., 2021; Seguella und Gulbransen, 2021; Cheadle et al., 2014b). Hierauf werde ich in den folgenden Kapiteln näher eingehen.

Zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit stellten wir die Hypothese auf, dass diese

beiden Signalwege (purinerges und cholinerges Signalweg) entscheidende Faktoren in intestinalen inflammatorischen Vorgängen und damit auch in der Immunreaktivität der EGZ darstellen. Weitere Signalwege, die eine Rolle spielen könnten standen außerhalb des Fokus dieser Arbeit und werden daher nicht behandelt.

1.4.1 Die purinergen Signalwege

Die purinergen Rezeptoren werden, je nach Ligand, in verschiedene Untergruppen eingeteilt. Die P₂-Rezeptoren einerseits, die wiederum in P₂X- und P₂Y-Rezeptoren eingeteilt werden (Burnstock und Kennedy, 1985; Abbracchio und Burnstock, 1994). Die ionotrope P₂X-Rezeptorgruppe beinhaltet 7 verschiedene Subtypen und wird durch ATP aktiviert, was je nach Subtyp unterschiedliche Signalkaskaden in Gang setzt (North, 2002; Burnstock, 2006). Die acht Subtypen der P₂Y-Rezeptoren (P₂Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}) sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die neben ATP auch durch ADP, UTP und UDP aktiviert werden können (Burnstock, 2006).

Generell können die einzelnen Rezeptoren unterschiedlich, sogar konträr reagieren, je nach Sensitivität für extrazelluläres ATP. So reagieren die Subtypen P₂X₁, P₂X₃, P₂Y₂ und P₂Y₁₃ schon auf sehr niedrige Mengen von ATP (<1 µM), während die Rezeptoren P₂X₂, P₂X₄, P₂X₅, P₂X₆, P₂Y₁, P₂Y₄ und P₂Y₁₁ ab Mengen von 1 – 20 µM ATP aktiviert werden (Bours et al., 2006; Trautmann, 2009). Diese geringeren Mengen sind beispielsweise bei leichten Infektionen mit schwachen Pathogenen messbar und hemmen unter anderem die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (La Sala et al., 2001; Di Virgilio, 2007). So hat ATP beispielsweise über den P₂Y₁₁-Rezeptor auf Immunzellen eine immunsuppressive Wirkung (Di Virgilio et al., 2009), während Konzentrationen von über 100 µM an ATP über den P₂X₇-Rezeptor vor allem proinflammatorisch wirken (Di Virgilio, 2007; Di Virgilio et al., 2017).

Die Liganden dieser Rezeptoren gehören zu der Familie der Purine. Sie werden von Zellen aller Gewebeformen gebildet und sezerniert. Ihre Rezeptoren sind auf fast allen Zellen zu finden (Verkhatsky und Burnstock, 2014). Sie werden über verschiedene Wege nach extrazellulär sezerniert, unter anderem über Transporter, Exozytose und Diffusion über Membrankanäle (Abbracchio et al., 2009; Fitz, 2007). Zudem kommt es auch nach Zelltod oder mechanischem Stress zu einer erhöhten extrazellulären Konzentration der Purine, insbesondere von ATP (Collis und Hourani, 1993; Saiag et al., 2009). Purinerge

Signalkaskaden haben viele verschiedene Funktionen. ATP als Hauptligand beispielsweise ist nicht nur ein wichtiger Neurotransmitter des intestinalen Nervensystems (Drury und Szent-Györgyi, 1929; Burnstock et al., 1970), sondern ist daneben auch für Zellproliferation und -differenzierung, Neuromodulation, Plättchenaggregation und exokrine und endokrine Sekretion mitverantwortlich (Burnstock, 2006; Di Virgilio et al., 2020).

Im GI-Trakt ist eine erhöhte ATP-Sekretion nicht nur auf Zellschädigung bzw. -tod zurückzuführen, sondern wurde unter anderem auch schon nach mechanischer Reizung des Darms gemessen, die eine erhöhte aktive Sekretion durch Darmepithelzellen zur Folge hatte (Wynn et al., 2003). ATP wird nach der Sekretion vergleichsweise schnell wieder von Ektonukleotidasen abgebaut. Dazu gehören die Nukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase-1 (NTPDase1, oder auch CD39 genannt) und die Ekto-5'-nukleotidase (CD73), die zusammen ATP und ADP zu AMP und schließlich Adenosin abbauen (Robson et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer Aufregulation von CD39 bei Patienten mit CED kommt und dass bei CD39-knockout-Mäusen eine verstärkte Entzündungsreaktion im Darm erzeugt wird (Friedman et al., 2009). Die NTPDase2, die zu den NTPDasen gehört, konnte auf der EGZ nachgewiesen werden (Braun et al., 2004). Adenosin als Abbauprodukt von ATP ist ein Ligand der Subgruppe der purinergeren Rezeptoren, der vier P1-Rezeptoren (A_1 , A_{2A} und B , A_3) (Ralevic und Burnstock, 1998). Diese Rezeptoren sind ebenfalls G-Protein gekoppelt. Ihre Wirkung wird als antiinflammatorisch beschrieben (Fredholm, 2007; Haskó und Cronstein, 2013). So wird der A_{2B} -Rezeptor erst unter pathologischen Umständen überhaupt aktiviert (Haskó et al., 2008). Der A_{2A} -Rezeptor hat immunmodulatorische Funktionen. Er ist in der Lage eine Anergie von T-Zellen trotz Stimulation herbeizuführen, was wiederum zu einer fehlenden Immunantwort mit niedrigerer IL-2- und IFN- γ -Sekretion führt. Zudem kommt es über diesen Rezeptor auch zu einer Hemmung der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-12 und TNF- α und zu einer Erhöhung von TGF- β (Haskó et al., 2000; Zarek et al., 2008). Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass der A_3 -Rezeptor-Agonist IBMeca dosisabhängig die Produktion des Chemokins MIP-1 α (Makrophage-inflammatory-protein) und der Zytokine IL-6 und IL-12 in Makrophagen hemmt (Szabo et al., 1998; Kenneth A. Jacobson et al., 2018).

Die Expression purinerger Rezeptoren durch die EGZ konnte nachgewiesen werden,

wobei eine genaue Identifizierung der Subtypen lange Zeit misslang (Kimball und Mulholland, 1996). Schließlich gelang unter anderem mittels mRNA-Expressions-Profilanalyse die Identifizierung von verschiedenen Subtypen der P1, P2X- und P2Y-Rezeptoren, wobei teilweise ein unterschiedliches Expressionsmuster der Rezeptoren auf den EGZ durch Induktion einer Inflammation gezeigt werden konnte (Liñán-Rico et al., 2016; Ochoa-Cortes et al., 2016).

Die genaue Funktion der einzelnen durch die EGZ exprimierten purinergen Rezeptoren vor allem in pathologischen Prozessen war weiterhin lange unklar. Generell wurde eine Beteiligung von P2-Rezeptoren auf EGZ an der Kommunikation zwischen Neuronen und EGZ (Gulbrandsen und Sharkey, 2009) sowie an dem EGZ-vermittelten Zelltod der Neuronen während einer Kolitis nachgewiesen (Brown et al., 2016). Auch die Beteiligung an der Regulation der gastrointestinalen Motilität wurde festgestellt (McClain et al., 2014). Bei Nachweis einer Zytokinausschüttung nach Stimulation von EGZ mit ATP blieb der verantwortliche Subtyp ebenfalls unklar, bis schließlich 2021 mittels Analyse der Genexpressionsprofile nach Stimulation der Nachweis gelang, dass ATP als Trigger der aktivierten EGZ über den P2X₂-Rezeptor agiert und dass eine spezifische Antagonisierung dieses Rezeptors unter anderem die Entzündungsaktivität reduzieren kann (Schneider et al., 2021).

Ein Zusammenhang zwischen entzündlichen Vorgängen und einer erhöhten Expression der P1-Rezeptoren auf EGZ wurde ebenfalls detektiert (Ochoa-Cortes et al., 2016; Antonioli et al., 2013). Es wurde die Hypothese eines „purinergen Switch“ innerhalb der EGZ im Sinne einer veränderten Expression von ATP hin zu ADP/Adenosin/UTP als Reaktion auf entzündliche Prozesse aufgestellt (Liñán-Rico et al., 2016).

Zusammenfassend spielen die purinergen Rezeptoren und ihre Liganden eine wichtige Rolle in der Immunmodulation, wobei gesagt werden kann, dass ATP als DAMP inflammatorische Prozesse bewirkt und Adenosin im Gegenzug eine antiinflammatorische Wirkung hat (Di Virgilio et al., 2020). Dies und die oben genannte Hypothese des „purinergen Switch“ innerhalb der EGZ als Reaktion auf entzündliche Prozesse weist auf einen negativen Feedback-Mechanismus hin, der Möglichkeiten für gezielte Therapien bietet. Da beide Rezeptorsubtypen von EGZ exprimiert werden stellen wir die Hypothese auf, dass die EGZ als zentrale Zelle dieses Feedback-Mechanismus dient.

1.4.2 Der cholinerge Signalweg

Diese Arbeit untersucht neben den purinergen auch die cholinergen Rezeptoren, die vor allem in der Reizweiterleitung und Kommunikation innerhalb des Nervensystems eine Rolle spielen (Goyal und Hirano, 1996; Gershon, 1999), jedoch in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus entzündlicher Pathogenesen rückte (Rueda Ruzafa et al., 2021; Goverse et al., 2016). Man unterscheidet zwei Gruppen der Acetylcholinrezeptoren (AChR), die nikotinergen Rezeptoren, die als ligandengesteuerte Ionenkanäle fungieren und die muskarinergen, G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die nikotinergen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) sind vor allem für die schnelle Reizweiterleitung in den Ganglien im Sinne einer exzitatorischen Nervenstimulation verantwortlich (Colquhoun und Patrick, 1997; Kirchgessner und Liu, 1998; Galligan et al., 2000). Die muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) steuern vor allem die Darmmotilität und die Mukosasekretion (North und Tokimasa, 1982; North et al., 1985). Ihr Ligand ACh ist ein Neurotransmitter, der in präsynaptischen Nervenenden synthetisiert wird und Bestandteil vieler wichtiger Prozesse im ENS ist (Gershon, 2008; Hansen, 2003b; Furness, 2000; Taylor und Brown, 1999). Neben den neuromuskulären Funktionen des cholinergen Systems gibt es bereits immer mehr Hinweise für weitere Funktionen auch innerhalb des Immunsystems (Pavlov und Tracey, 2006). So wurde bereits gezeigt, dass eine bestimmte Subgruppe von nAChR des Vagusnervens eine antiinflammatorische Wirkung, unter anderem durch die Reduktion von TNF-Leveln (Rosas-Ballina und Tracey, 2009; Borovikova et al., 2000) und die Aufrechterhaltung der epithelialen Schutzbarriere (Costantini et al., 2012), aufweist. Außerhalb des Nervensystems werden den cholinergen Rezeptoren bereits wichtige immunmodulatorische Funktionen zugesprochen, wie beispielsweise die Aktivierung von Lymphozyten oder auch die Aktivierung der Tyrosinkinase JAK2, die wiederum zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 und damit zur Hemmung der Sekretion proinflammatorischer Zytokine führt (Jonge et al., 2005; Goverse et al., 2016).

Auch in der Aktivierung von EGZ scheinen cholinerge Signalwege eine Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass nach einem proinflammatorischen Stimulus ACh die EGZ über nAChR aktiviert, was als Erhöhung der Expression von GFAP zu messen war. Dieser Effekt führte zu einer Verstärkung der Barrierefunktion der Mukosa durch Inhibition

bestimmter Faktoren, wie beispielsweise des Transkriptionsfaktors NF- κ B und damit zum Schutz vor Schäden durch inflammatorische Prozesse (Cheadle et al., 2014a).

Auch eine Hemmung der Zytokinausschüttung in Immunzellen wie beispielsweise Makrophagen konnte bereits gezeigt werden (Chernyavsky et al., 2010), ebenso wie eine Aktivierung antiinflammatorischer Prozesse über den IL-10-Rezeptor, was wiederum eine Senkung der Sekretion von TNF zur Folge hatte (Jonge et al., 2005). Ob die cholinergen Rezeptoren, und unter ihnen vor allem die nikotinergen Rezeptoren zusätzlich die Zytokinproduktion der EGZ herunterregulieren können und damit eventuell Bestandteil des negativen Feedback-Mechanismus innerhalb der EGZ sind, gilt es zu erforschen und ist Bestandteil dieser Arbeit.

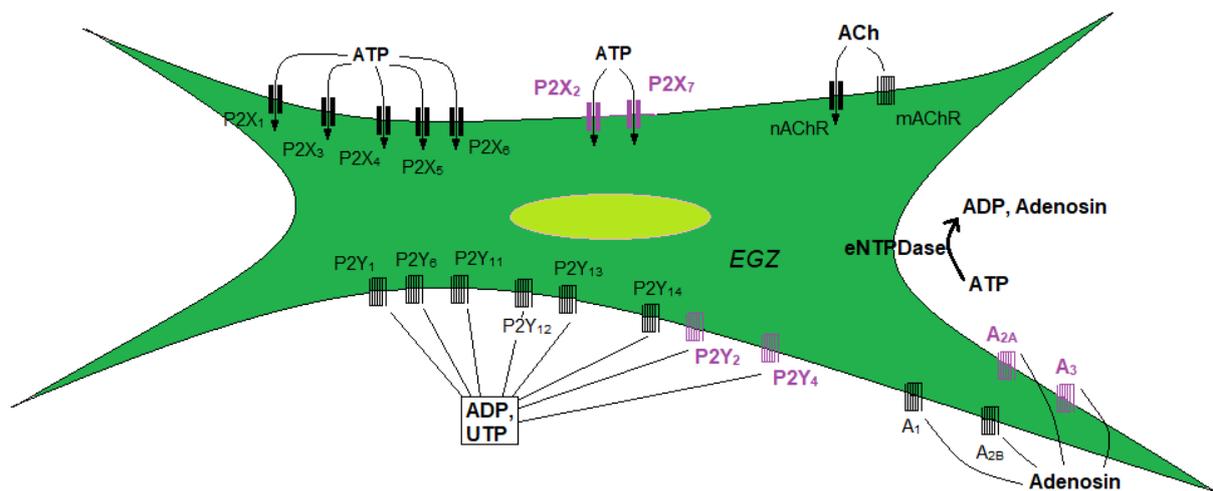


Abb. 2: Purinerge und cholinerge Rezeptoren auf der EGZ

Vereinfachtes Schaubild einer enterischen Gliazelle mit purinergen (P2X, P2Y und A₁₋₃) Rezeptoren und ihren Liganden ATP, ADP, Adenosin und UTP, der eNTPDase, die ATP zu ADP und Adenosin abbaut und den cholinergen Rezeptoren (mAChR= muskarinerges Acetylcholinrezeptor, nAChR= nikotinerges Acetylcholinrezeptor) und ihrem Liganden Acetylcholin (ACh). Die violett-markierten Rezeptoren stellen die für die Fragestellung dieser Arbeit relevanten Subtypen dar.

1.5 Die EGZ als mögliche therapeutische Zielstruktur

Entzündliche Darmerkrankungen sind ein wichtiges Thema der Gastroenterologie und der Viszeralchirurgie, sei es in Form fulminanter, akuter Verläufe, bei denen Perforationen eine chirurgische Intervention nötig machen oder in Form von CED wie MC oder CU, deren vielseitige Komplikationen ebenfalls zu Vorstellungen der betroffenen Patient*innen

in den beiden medizinischen Fachbereichen führen (Calkins und Mendeloff, 1986; Eustace und Melmed, 2018).

Die EGZ als mögliche therapeutische Zielstruktur in Zusammenhang mit entzündlichen Vorgängen im Darm wurde gerade in den letzten Jahren mehrfach diskutiert (Cabarrocas et al., 2003; Neunlist et al., 2014; Ochoa-Cortes et al., 2016; Spear und Mawe, 2019). So wurde die mögliche Gabe des IL-1-Rezeptor-Antagonisten Anakinra als Therapie des POI untersucht (Stoffels et al., 2014). Stoffe, wie Palmitoylethanolamid (PEA), ein Fettsäureamid, dem antiphlogistische Eigenschaften zugesprochen werden, wird als möglicher Gegenspieler des teils als proinflammatorisch beschriebenen Gliazell-Marker S100B gesehen, was wiederum gastrointestinale Entzündungsgeschehen und Motilitätsstörungen verhindern soll (Esposito et al., 2014; D'Antongiovanni et al., 2021).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass neurodegenerative Prozesse, die häufig bei inflammatorischen Prozessen des GI-Traktes eine Rolle spielen, unter anderem über Connexin-43, P2X₇-Rezeptoren und Pannexin-1-Kanälen auf EGZ vermittelt werden (Gulbransen et al., 2012; Brown et al., 2016). Es wird daher diskutiert, ob eine therapeutische Modulation dieser Kanäle und Rezeptoren den Krankheitsverlauf vieler entzündlicher Erkrankungen im Darm positiv beeinflussen könnte (Spear und Mawe, 2019).

Liñán-Rico et al. entdeckten, dass inflammatorische Vorgänge Auswirkungen auf purinerge Signalketten innerhalb der EGZ in Form einer stärkeren Expression von Adenosin statt ATP haben (Liñán-Rico et al., 2016). Ein gezieltes Eingreifen in das gliale purinerge System könnte eine weitere Möglichkeit der therapeutischen Intervention darstellen. Da die EGZ teils gegenteilige Funktionen aufweisen, ist eine Untersuchung der genauen molekularen Mechanismen wichtig, um möglichst spezifische Zielstrukturen für bestimmte Therapieregime zu finden.

1.6 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die bisher teils noch unklare Rolle der purinergen und cholinergen Signalwege, ausgehend von den EGZ im Rahmen entzündlicher Vorgänge des GI-Traktes näher zu definieren. Dabei ist die ausgehende Hypothese, dass die EGZ durch eigene negative Feedbackmechanismen einerseits über die verschiedenen purinergen Rezeptoren inflammatorische Prozesse modulieren, sodass fulminante

Verläufe oder Chronifizierung verhindert werden kann. Zusätzlich besteht die Hypothese, dass intestinale entzündliche Vorgänge zentral über ACh und damit den Parasympathikus abgemildert werden können und dass dieser Signalweg ebenfalls über die EGZ erfolgt. Innerhalb der purinergen Rezeptoren wird sich diese Arbeit vor allem auf die P2-, A_{2A}- und A₃-Rezeptoren konzentrieren, wobei anzumerken ist, dass aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren nicht alle Subtypen tiefgehend untersucht werden konnten. Dazu wurden folgende Fragestellungen entwickelt und bearbeitet:

- Haben ATP und seine Abbauprodukte einen Einfluss auf die IL-6-Ausschüttung und sind die verantwortlichen Rezeptoren experimentell zu ermitteln?
- Ist ein negativer Feedback-Mechanismus im P1-P2-Rezeptorsystem zu erkennen?
- Gibt es die Möglichkeit über spezifische Hemmung verschiedener Rezeptoren die IL-6-Ausschüttung zu unterbinden?
- Hat ACh als wichtiger Neurotransmitter neben dem positiven Einfluss auf die GFAP-Produktion auch einen solchen Einfluss auf die IL-6-Sekretion?

1.7 Publikation

Teile dieser Arbeit waren Grundlagen für die Publikation von Schneider et al. (2021), in der eine Koautorenschaft besteht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Für die Gliazell-Isolation wurden C57BL/6-Mäuse beider Geschlechter im Alter von 7-12 Wochen verwendet, die von der Firma Janvier® (Le Genest Saint Isle, Frankreich) bezogen und unter Pathogen-freien Bedingungen im Haus für Experimentelle Therapie auf dem Gelände der Uniklinik gehalten wurden. Zusätzlich wurden für einzelne Experimente IL-6-Knock-Out-Mäuse von der AG Wunderlich (CECAD, Köln) verwendet. Die Unterbringung im Labor erfolgte in einem vollklimatisierten Raum mit Zugang zu handelsüblichem Mausefutter und Wasser und 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus.

2.1.2 Verwendete Chemikalien

Das ABM-Medium für die Zellkultur wurde von der Firma Lonza Group AG® (Köln, Deutschland) erworben, unter sterilen Bedingungen mit den jeweiligen Zusätzen (auf 500 ml ABM: 0,5 ml Ascorbinsäure, 1,25 ml Insulin, 0,5 ml HEGF, 0,5 ml GA-1000, 5 ml L-Glutamin und 15 ml FBS) versetzt und bei 4°C gelagert.

DMEM F12 der Firma Thermo Fisher Scientific® (Waltham, Massachusetts, USA) wurde ebenfalls unter sterilen Bedingungen mit Zusätzen (10 % FCS, 100 IU/Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1:100 Amphotericin, 20 µg/l Gentamycin, 6mM Glutamin) versehen. Der Krebs-Henseleit-Puffer, der für die EGZ-Isolationen zur Spülung verwendet wurde, wurde regelmäßig frisch angesetzt (Na^+ 137,4 µmol/l, K^+ 5,901 µmol/l, Ca^{2+} 2,5 µmol/l, Mg^{2+} 1,2 µmol/l, Cl^- 134 µmol/l, HCO_3^- 15,5 µmol/l, H_2PO_4^- 1,13 µmol/l und Glucose 11,5 µmol/l) und kurz vor Verwendung frisch mit 97 % O_2 und 3 % CO_2 begast und steril filtriert. Carbamoylcholin-Chlorid wurde von der Firma Sigma-Aldrich® (Taufkirchen, Deutschland) erworben.

Die restlichen Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, alle von der Firma Tocris® (Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich) erworben.

2.2 Methoden

2.2.1 Gliazell-Isolation

Zur Organentnahme wurden jeweils 3 Tiere mit sterilem Präparierbesteck median

laparotomiert und der gastroösophageale Übergang freipräpariert. Distal des Pars horizontalis duodeni, sowie am ileozökalen Übergang erfolgte die Absetzung des Intestinum tenue. Die Spülung des Dünndarmlumens erfolgte mit frisch oxygeniertem, gekühltem Krebs-Henseleit-Puffer. Dieser wurde zur Vorbereitung durch einen sterilen Einmal-Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 20 µm (Labomedic®) filtriert. Das Intestinum tenue wurde mit einer sterilen Präparier-Schere in maximal 2 cm lange Abschnitte geschnitten und in sterilem Krebs-Henseleit-Puffer bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gekühlt. Zur weiteren Präparation erfolgte die Auffädung der Darmabschnitte durch ihr Lumen auf einen Glasstab. Die Entfernung des Mesenteriums wurde mit einer sterilen Pinzette durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Präparation (Stripping) der Muscularis externa (ME) unter einem Stereomikroskop (Leica MZ8; Leica Microsystems GmbH, Eppelheim, Deutschland). Die präparierte ME wurde in frisch oxygeniertem Krebs-Henseleit-Puffer aufgefangen. Dabei wurde der Puffer alle 5 Minuten durch neuen, frisch oxygenierten Puffer ersetzt.

Die weitere Verarbeitung des entnommenen Materials, sowie der Zellkultur erfolgte zur Vermeidung einer Kontamination unter einer Sterilwerkbank mit vertikalem Luftstrom (Herasafe, ThermoScientific®). Die isolierte ME mit dem darin enthaltenen Plexus myentericus wurde für einen Verdau in ein Falcon Tube mit 5 ml DMEM F12 mit enthaltener Protease (5 mg/ml, Sigma-Aldrich®), Collagenase (20 mg/ml, Sigma-Aldrich®) und BSA (50 mg/ml, Sigma-Aldrich®) überführt und bei 37°C für 12 Minuten in einem Wasserbad inkubiert. In dem GentleMACS-Dissociator® der Firma Miltenyi® wurde anschließend der Verdau in eine Einzelzell-Suspension dissoziiert. Dafür wurde das Programm „brain_02“ für neuronale Gewebe verwendet.

Nach Zugabe von 10 ml DMEM F12 mit den oben beschriebenen Zusätzen wurde der Verdau bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Zur Beendigung des Verdau-Prozesses wurde nach Abnahme des Überstandes mit kaltem, sterilem, frisch oxygeniertem Krebs-Puffer gespült. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurde das Pellet mit 10 ml ABM-Medium (Lonza®) mit Zusätzen aufgenommen und auf eine Petrischale gegeben. Unter dem Stereomikroskop wurden die darin enthaltenen Ganglien mit einer Pipette mit einem Fassungsvermögen von 200 µl aufgenommen. 10-20 entnommene Ganglien wurden jeweils auf eine Kavität einer Mikrotiterplatte mit 24 Kavitäten aus Kunststoff der Firma VWR International® ausgesät. Diese Platte wurde

einen Tag zuvor mit 0,5%iger Gelatinelösung (Sigma Aldrich®) beschichtet, um ein besseres Anwachsen der in den Ganglien befindlichen Gliazellen zu gewährleisten.

Die Ganglien wurden anschließend zur Kultivierung in den Mikrotiterplatten in einem Inkubator (Heracell, ThermoScientific®) mit 37°C für 10 bis 14 Tage aufbewahrt. Der Mediumwechsel mit frischem, sterilem ABM-Medium mit den oben beschriebenen Zusätzen erfolgte alle 72 Stunden. Hierfür wurde das gekühlte Medium zuvor im Wasserbad bei 37°C aufgewärmt. Das Wachstum der Zellkultur wurde regelmäßig unter dem Lichtmikroskop untersucht. Nach durchschnittlich 12 Tagen war die Proliferation der Zellkultur ausreichend.

2.2.2 Zellkontrolle

Um sicherzustellen, dass die pipettierten ME-Fragmente EGZ enthielten, wurde zu jeder Gliazell-Isolation eine Kontrolle angefertigt. Dafür wurden bis zu 5 Ganglien auf ein Gelatine-beschichtetes Deckglas gegeben und nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C analog zu den Gliazellen immunhistochemisch für GFAP, SMA und CD31 gefärbt (siehe **Kap. 2.2.5**).

2.2.3 Gliazell-Split

Für alle nachfolgenden Experimente wurden vergleichbare Zellkulturpopulationen benötigt. Hierfür wurden die Gliazellen ausgezählt und in definierter Anzahl auf neue Mikrotiterplatten (Passagierung bzw. *Split*) gegeben. Zur Vorbereitung für die Auszählung wurde das alte ABM-Medium verworfen und die Zellen in den Kavitäten mit vorgewärmtem, sterilem PBS gewaschen. Um die Zellen von den Platten zu lösen wurden sie mit 300-500 µl 0,05%ige Trypsin-Lösung der Firma ThermoScientific® für 15-20 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Vorgang wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert, wobei eine morphologische Änderung der zuvor sternförmigen Zellen zu sphärischen Formen als erfolgreiche Ablösung verstanden wurde. Es wurde 1-2-mal mit Trypsin gewaschen. Zuletzt wurden die in dem Trypsin gelösten Zellen durch einen Aufsatzfilter mit einer Porengröße von 40 µm gegeben, um eventuell enthaltene größere Zellen oder Gewebe herauszufiltern. Zur Isolierung der Gliazellen wurde die Zell-Trypsin-Lösung in einem 50 ml Falcon bei 30 G für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Trypsin-Überstandes konnte der Zellniederschlag mit 500 µl ABM-Medium mit Zusätzen resuspendiert werden.

Die Färbung der Zellen erfolgte mit Trypanblau der Firma Sigma-Aldrich®. Unter dem Lichtmikroskop konnte mithilfe einer Zählkammer die Zellzahl bestimmt werden, wobei die Formel galt:

$$\text{Zellen/ml} = \text{gezählte Zellen pro Quadrat} \times 10^4$$

Die Gliazellen wurden schließlich zu jeweils 50.000 Stück pro Kavität ausgesät. Für Versuche wurden Mikrotiterplatten mit 48 Kavitäten verwendet, für die Immunhistochemie Platten mit 12 Kavitäten, in denen zusätzlich Deckgläser eingelegt wurden. Zur Kontrolle der Reinheit der Zellkultur und der Anzahl der Zellen wurden mindestens 2 Deckgläser mit jeweils 50.000 Zellen beimpft. Diese wurden nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C mit verschiedenen Antikörpern gefärbt (*Staining*, siehe **Kap. 2.2.5**). Die frisch ausgesäten Zellen wurden zur Vorbereitung auf das Experiment ebenfalls für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Für einen Versuchsansatz wurden jeweils 3 bis 4 Mäuse verwendet.

2.2.4 Allgemeiner Versuchsaufbau

Nach 24 Stunden Inkubation konnten die Zellen für die Stimulationsmedien vorbereitet werden. Hierfür wurden sie zunächst in aufgewärmtem ABM-Medium ohne Zusätze für 1 Stunde kultiviert. Für die Stimulation wurden die einzelnen Stoffe in jeweils 500 µl ABM-Medium ohne Zusätze vorbereitet. Als Kontrolle galt jeweils das Medium selbst. Das jeweilige Stimulationsmedium und das Kontrollmedium wurden in jeweils 5 verschiedene Kavitäten einer Mikrotiterplatte zu der Zellkultur gegeben. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Inkubation bei 37°C. Nach dieser Inkubationszeit wurde das jeweilige Medium in den einzelnen Kavitäten entnommen und in Mikroreaktionsgefäße der Firma Eppendorf® mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml überführt. Diese wurden auf Eis gelagert und schließlich bei 12000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Mikroreaktionsgefäße gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Auswertung erfolgte die Lagerung bei -80°C. Zur Messung der Höhe der Reaktion der Zellkulturen auf das jeweilige Stimulationsmedium wurde der Gehalt an IL-6 mittels ELISA in diesem Überstand gemessen.

2.2.4.1 IL-6-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (IL-6-ELISA)

Verwendet wurde das mouse-IL-6-ELISA-Standard Kit von Biolegend®. Anhand des Manuals erfolgten folgende Schritte:

Auf die benötigten Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten wurden ein in *Coating-Buffer* gelöster *Capture Antibody* gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die verwendeten Platten wurden während der Inkubationszeiten jeweils auf einen Schüttler gegeben. Am nächsten Tag wurden die Platten 3-5-mal mit PBS gewaschen und die Reaktion in den Kavitäten durch die Assay Lösung für eine Stunde gestoppt. Nach einem weiteren Waschlösung wurden die in der Standardlösung 1:25 verdünnten Proben und eine Standardreihe zum Vergleich für weitere 2 Stunden in die Kavitäten gegeben. Jeweils 2 Kavitäten wurden mit derselben Probe befüllt, um mögliche Messfehler zu minimieren. Die Standardreihe wurde von 1:500 bis 1:8 über 8 Kavitäten verdünnt. Die Platte wurde nach der Zeit erneut gewaschen und mit dem *Detection Antibody* eine Stunde inkubiert. Im nächsten Schritt wurde nach einem Waschlösung das Enzym *Avidin-horseradish-peroxidase* (Avidin-HRP) auf die Wells gegeben und weitere 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgte eine Waschung für 1-2 Minuten in 5-7 Durchläufen. Als letzten Schritt wurde das *TMB-Substrate* auf die Platten gegeben, wodurch es je nach IL-6-Konzentration zu einer Verfärbung der Lösung kam. Der Vorgang dauerte unterschiedlich lang, durchschnittlich 5 Minuten. Mithilfe von Schwefelsäure als Stopplösung wurde der Vorgang gestoppt. Die Platte wurde anschließend durch das Mikrotiterplatten-Lesegerät der Tecan Group AG® (microplate readers®) und der Magellan™ V7.2-Software ausgelesen. Die gemessenen Werte wurden in mg/ml umgerechnet und als Kurvendiagramm angegeben.

2.2.4.2 Versuchsreihen

Die Untersuchung der einzelnen Rezeptoren auf den isolierten EGZ wurde anhand von 4 Versuchsreihen (a – d) durchgeführt. Diese waren die

- a) IL-6-Knock-out-Versuchsreihe: Stimulation purinerge Rezeptoren aus IL-6-defizienten Mäusen mit ATP
- b) cholinerge Versuchsreihe: unselektive Stimulation des Acetylcholinrezeptors, vergleichend hierzu parallele Stimulation der purinergen Rezeptoren
→ Carbamoylcholinchlorid(-ATP) –Versuchsserie
- c) IL-1β-Versuchsreihe: Stimulation des IL-1β-Rezeptors auf isolierten EGZ

d) purinerge Versuchsreihe:

- 1) ATP/ UTP γ S -Versuchsserie: Stimulation des P2X- und -Y-, sowie spezifisch des P2Y_{2/4}-Rezeptors
- 2) P2-Rezeptor-Versuchsreihe:
 - Suramin(-ATP/IL-1 β) -Versuchsserie: unselektive Antagonisierung des P2-Rezeptors, vergleichend hierzu parallele Stimulation der purinergen Rezeptoren
 - A740003(-ATP) -Versuchsserie: isolierte Antagonisierung des P2X₇-Rezeptors, vergleichend hierzu parallele Stimulation der purinergen Rezeptoren
- 3) Adenosinrezeptor-Versuchsreihe
 - CGS21680(-ATP) -Versuchsserie: isolierte Stimulation des A_{2A}-Rezeptors, vergleichend hierzu parallele Stimulation der purinergen Rezeptoren
 - 2-CL-IBMeca(-ATP) -Versuchsserie: isolierte Stimulation des A₃-Rezeptors, vergleichend hierzu parallele Stimulation der purinergen Rezeptoren

Es wurden mindestens zwei Versuchsdurchläufe zu einer Reihe durchgeführt, um mögliche Schwankungen durch eine Variabilität innerhalb der einzelnen Zellkulturen gering zu halten.

2.2.5 Immunhistochemie

2.2.5.1 IHC der Zellkultur

Die kultivierten Zellen wurden nach dem Zell-*Split* auf Deckgläser ausgesät. Dafür wurden je zwei Deckgläser mit jeweils 100.000 EGZ beimpft. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit 4 % PFA (Histofix 4 %, Roth®) für 20 Minuten fixiert. Es erfolgte ein Waschen der Deckgläser mit PBS. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte für 20 Minuten mit 0,2 % Triton-X-100 (Applichem®) bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 5 Minuten mit PBS gewaschen und 1 Stunde mit 3 % BSA/PBS + 1 % P/S geblockt. Als Primär-Antikörper wurden anti-GFAP- (Dako®) als Marker für die EGZ, anti-alpha-smooth-muscle-actine (SMA, Dianova®) für die Glattmuskelzellen und anti-CD31-Antikörper (Pharmingen®) für mögliche Endothelzellen verwendet. Sie wurden in 1 % BSA/PBS + 1 % P/S angesetzt und auf die Deckgläser gegeben. Diese wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde erneut 3-mal jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Als Sekundär-Antikörper wurden für GFAP der Antikörper FITC (donkey-anti-rabbit FITC, Dianova®), für SMA Cy3 (donkey-anti-mouse Cy3, Dianova®) und für CD31 ALEXA 647

(goat-anti-rat ALEXA647, Invitrogen®) verwendet. Diese wurden für 1 Stunde abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS (3x5 Minuten) wurden die Zellkerne mit DAPI (Biolegend®) für weitere 15 Minuten gefärbt. Nach Eindeckung der Deckgläser mit dem Eindeckmedium Fluoro-Gel (ThermoScientific®) konnte das Ergebnis unter dem Fluoreszenzmikroskop (Eclipse TE 2000-E; Nikon®, Düsseldorf, Deutschland) ausgewertet werden.

Für die Zellzahlbestimmung wurden jeweils 4 bis 5 zufällig gewählte, repräsentative Abschnitte des Deckglases in 200-facher Vergrößerung abgebildet und die abgebildeten jeweiligen Zellanteile an der Gesamtzellzahl bestimmt.

Für das IL-6-Staining wurde ein anti-IL-6-Antikörper (abcam®) verwendet. Um die Reaktivität der Zellkultur auf den Antikörper zu beurteilen, wurden unstimulierte und mit 100 µM ATP stimulierte Zellen hierfür verwendet.

2.2.5.2 Muscularis-externa-Präparate

Es erfolgte ebenfalls eine Immunhistochemie der Muscularis-Präparate (whole-mounts, siehe **Abb. 1**). Dafür wurde das Jejunum präpariert und in ca. 1 cm lange Abschnitte geteilt. Nach Reinigung der Abschnitte mit KHB wurden sie in eine mit gekühltem KHB gefüllte Sylgard®-Schale gegeben. Es erfolgte ein Längsschnitt in der Nähe des Mesenteriums. Der aufgeschnittene Dünndarm wurde jeweils an der Längsseite unter leichter Dehnung mit Stahlnadeln auf der Schale fixiert. Unter dem Lichtmikroskop erfolgte die Präparation der Muscularis externa mithilfe von Präparations-Pinzetten. Das Präparat wurde für 10 Minuten mit 100%igem Alkohol fixiert. Die Färbung wurde analog zu der oben beschriebenen Immunhistochemie der Zellkultur durchgeführt. Es wurde auf die anti-SMA-, -DAPI- und -CD31-Antikörper verzichtet. Verwendet wurde der bereits beschriebene anti-GFAP-Antikörper und ein anti-S100β-Antikörper (ThermoScientific®).

Die Auswertung wurde ebenfalls mit dem Fluoreszenzmikroskop der Firma Nikon® durchgeführt.

2.2.6.1 IL-6-Knock-Out-Versuchsreihe

Als Kontrolle unserer Versuche wurde ein Vergleichsversuch mit Black-6-Mäusen und IL-6-Knock-Out-Mäusen durchgeführt. Wir stimulierten beide Zellgruppen mit 100 µM ATP und verglichen die IL-6-Sekretion untereinander und mit der jeweiligen Kontrolle.

2.2.6.2 IL-1 β -Stimulation

Hierfür wurde eine Konzentrationsreihe von 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml IL-1 β angelegt und die IL-6-Sekretion im Medium nach 24 Stunden Inkubationszeit gemessen.

2.2.6.3 ATP/UTP γ S-Stimulation

Es wurden EGZ über 24 Stunden mit einer Konzentrationsreihe von 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M ATP (Tocris[®]) bzw. UTP gamma trisodium (UTP γ S, ein spezifischer P2Y2/4-Rezeptor-Agonist, Tocris[®]) stimuliert. Um eine mögliche Potenzierung der Wirkung zu untersuchen, wurde zudem eine simultane Stimulation mit beiden Stoffen durchgeführt. Dabei wurden jeweils 100 μ M ATP mit einer Konzentrationsreihe von 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M UTP γ S kombiniert.

2.2.6.4 P2-Rezeptor-Versuchsreihe

Es erfolgte eine erste Testreihe mit Stimulation der EGZ mit einer Konzentrationsreihe von 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M und 300 μ M Suramin hexasodium salt (Suramin, Tocris[®]), dem unselektiven P2-Antagonisten, und anschließend mit 100 μ M ATP in Kombination mit Suramin in den oben genannten Konzentrationen. Verglichen wurden die Ergebnisse mit der Kontrollgruppe und im zweiten Versuchsteil mit der alleinigen ATP-Stimulation.

Der Versuch wurde wiederholt, wobei nicht mit ATP, sondern mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-1 β (1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml) in Kombination mit 100 μ M Suramin stimuliert wurde.

2.2.6.5 P2X₇-Rezeptor-Versuchsreihe

Zur Untersuchung eines purinergen Rezeptorsubtyps wurden die kultivierten EGZ zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen (10 und 30 μ M) des P2X₇-Rezeptor-Antagonisten A740003 (Tocris[®]) behandelt. In einer weiteren Versuchsreihe wurden die EGZ mit dem Antagonisten in Kombination mit 100 μ M ATP über 24 Stunden stimuliert.

2.2.6.6 Adenosin-Rezeptor-Versuchsreihe

Diese Versuchsreihe teilte sich in zwei Versuchsgruppen auf. In der ersten wurde der A_{2A}-Rezeptor-Agonist CGS21680 (Tocris[®]) in den Konzentrationen 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M und

10 μM jeweils als alleiniger Wirkstoff und in Kombination mit 100 μM ATP verwendet. In der zweiten Versuchsgruppe verwendeten wir äquivalent den A_3 -Rezeptor-Agonisten 2-Cl-IBMeca (Tocris[®]) in den Konzentrationen 0,02 μM , 0,2 μM , 2 μM und 20 μM nach dem gleichen Schema.

2.2.6.7 Acetylcholin-Rezeptor-Versuchsreihe

In dieser Versuchsreihe untersuchten wir die Auswirkungen der ACh-Rezeptoren auf die IL-6-Sekretion mithilfe des unselektiven Agonisten Carbamoylcholin-Chlorid (Carbachol, Sigma-Aldrich[®]). Hierfür stimulierten wir kultivierte EGZ zunächst mit Carbachol und anschließend in Kombination mit 100 μM ATP, jeweils in den Konzentrationen 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM und 10 μM .

Weitere Versuchsreihen mit spezifischeren Agonisten waren geplant, wurden aber angesichts der negativen Ergebnisse als nicht mehr relevant abgesagt.

2.2.7 Statistische Datenanalysen

Als Software zur statistischen Auswertung diente das Programm GraphPad Prism 4[®]. Die ermittelte absolute IL-6-Ausschüttung wurde als relative (rel.) IL-6-Ausschüttung in Bezug zur jeweiligen Kontrolle ausgerechnet. Hierfür wurde der Mittelwert der Kontrollgruppe zur Berechnung verwendet. Diese Werte wurden jeweils als Mittelwerte \pm mittlere Standardabweichung als Streuungsmaß angegeben und mittels verschiedener statistischer Verfahren ausgewertet. Hierfür wurde für die Auswertungen der Versuchsreihen 2.2.6.1 bis 2.2.6.7, mit Ausnahme der Versuchsreihe der isolierten EGZ-Stimulation mit 100 μM ATP (siehe **Abb. 8B**) sowie der IL-6-KO-Versuchsreihe (siehe **Abb. 10**), jeweils der Kruskal-Wallis-Test mit anschließender Dunn-Prozedur als Post-hoc-Test angewendet (siehe **Abb. 5, 6, 7, 8 (A und C), 9, 12, 13, 14 und 15**). Für die Versuchsreihe der isolierten Stimulation mit 100 μM ATP (siehe **Abb. 8B, Kap. 2.2.6.3**) wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Für die IL-6-KO-Versuchsreihe wurde ein Two-way Anova mit anschließendem Bonferroni posttest verwendet (siehe **Abb.10, Kap. 2.2.6.1**). Als Signifikanzlevel galten * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1 Immunhistochemie

3.1.1 Die kultivierten EGZ exprimieren GFAP

Zur Untersuchung und Differenzierung der einzelnen Zelltypen der gewonnenen Zellkultur aus der Muscularis externa erfolgte eine immunhistochemische Färbung mit dem zum Zeitpunkt der Arbeit gängigsten Marker für die EGZ (GFAP), Marker für Glattmuskelzellen (SMA) und Endothelzellen (CD31). Nach Färbung mit GFAP zeigte sich ein deutliches Signal unter dem Mikroskop. Neben den GFAP-positiven EGZ waren auch SMA-positive Glattmuskelzellen (GMZ) detektierbar (siehe **Abb. 3**). CD31-positive Endothelzellen waren nicht detektierbar.

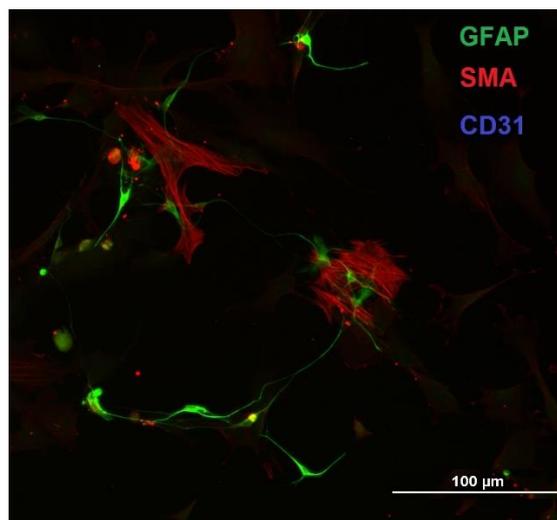


Abb. 3: Expression von GFAP in den kultivierten, isolierten EGZ
 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach immunhistochemischer Färbung mit einem anti-GFAP- (FITC, grün), -SMA- (Cy3, rot) und -CD31-Antikörper (ALEXA 647, blau).
 Skala = 100 µm

Diese Bilder entstanden 24 Stunden nach der Auszählung und der ersten Passagierung (*Split*) der Zellen. Nach längerer Kultivierung (8 Tage nach dem *Split*) in ABM-Medium zeigte sich, dass die GFAP+-Zellen proliferierten (siehe **Abb. 4**). Die Morphologie der EGZ innerhalb dieser Kultur war sehr heterogen. Von großen teils sternförmigen Zellen über

schmalere mit dünnerem Zellkörper bis zu Zellen mit langen dünnen Ausläufern.

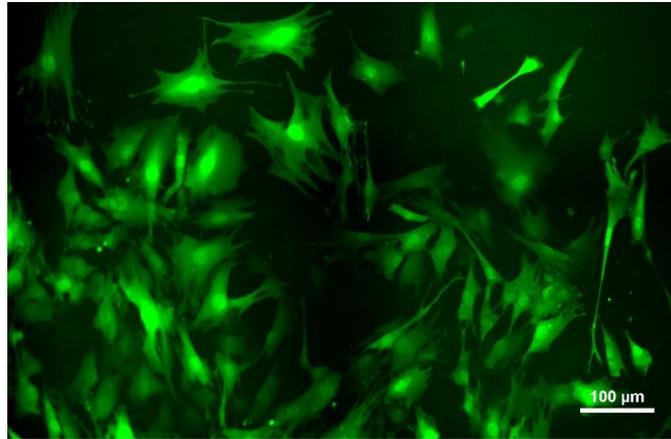


Abb. 4: Morphologisch unterschiedliche EGZ in der Zellkultur
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme isolierter EGZ 8 Tage nach dem Split nach immunhistochemischer Färbung mit einem anti-GFAP-Antikörper (FITC, grün). Skala 100 µm.

3.1.2 Die EGZ sind prozentual der häufigste vorliegende Zelltyp in der Zellkultur

Zur Ermittlung des prozentualen Anteils der EGZ in der vorliegenden Zellkultur wurden Deckgläser von 5 verschiedenen Versuchen besät und unter dem Elektronenmikroskop nach einem Staining mit dem anti-GFAP-, -SMA- und -CD31-Antikörper untersucht. Nach dem Zufallsprinzip wurden die einzelnen Zelltypen in verschiedenen Abschnitten (n= 4-5) in den einzelnen Deckgläsern gezählt. Ziel dieses Versuchs war die Untersuchung auf die Reinheit der Zellkultur. Angegeben wurde der Anteil des jeweiligen Zelltyps in %. Die EGZ nahmen mit einem Mittelwert von $54,28 \pm 1,97$ % die größte Zellgruppe ein, während die Glattmuskelzellen mit $22,27 \pm 2,36$ % die kleinste Gruppe darstellten. Daneben gab es einen Anteil von $23,45 \pm 3,13$ % unspezifischer Zellen (siehe **Abb. 5**).

Die Gruppe der unspezifischen Zellen stellte eine heterogene Anzahl von Zellen dar, deren Art nicht bestimmt werden konnte und die sich nicht mit den jeweiligen Antikörpern für GFAP, SMA oder CD31 anfärben ließen. Diese Ergebnisse zeigten, dass die EGZ mehr als die Hälfte der kultivierten Zellen ausmachten.

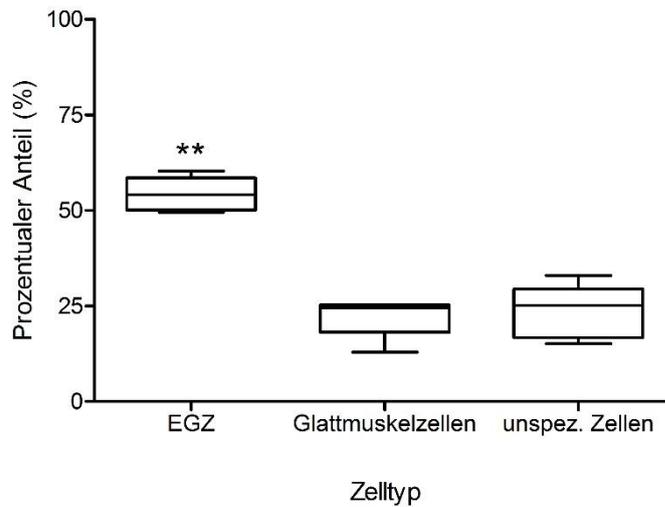


Abb. 5: Anteil einzelner Zelltypen in der EGZ-Kultur

Prozentuale Verteilung der ausgezählten Zelltypen der einzelnen Zellkulturen (n= 5, 100.000 Zellen pro Deckglas). Verwendet wurden die Mittelwerte der prozentualen Anteile der ausgezählten Zelltypen. ** p<0,01.

3.2 Reproduzierbare IL-6-Sekretion nach IL-1 β -Stimulation

Eine IL-6-Sekretion von EGZ, nicht jedoch von Glattmuskelzellen, nach Stimulation mit IL-1 β konnte bereits in vorangegangenen wissenschaftlichen Arbeiten gezeigt werden. Um einen Vergleich zu unseren Zellkulturen ziehen zu können sowie zur Bestimmung einer möglichen Zytokinausschüttung durch unsere Zellkultur, stimulierten wir die isolierten EGZ ebenfalls mit IL-1 β und bestimmten die daraus resultierende, messbare IL-6-Elevation. Es konnte eine dosisabhängige Elevation der relativen IL-6-Sekretion nach Stimulation mit IL-1 β bereits bei geringen Mengen (1 ng/ml) nachgewiesen werden (1 ng/ml: $2,87 \pm 0,48$; 10 ng/ml: $3,33 \pm 0,46$; 100 ng/ml: $7,24 \pm 1,31$ vs. Ctrl: $1 \pm 0,12$, siehe **Abb. 6**). Diese Beobachtung war vergleichbar mit Ergebnissen der Literatur.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass eine IL-1 β -Stimulation eine messbare IL-6-Elevation in unseren EGZ-Kulturen verursachte.

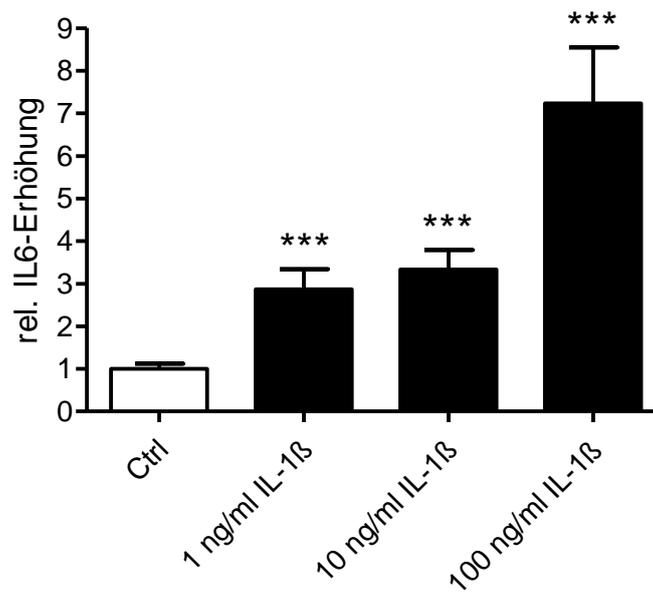


Abb. 6: Einfluss von IL-1 β auf die IL-6-Produktion von EGZ

Messung der IL-6-Proteinexpression mittels ELISA nach Stimulation der isolierten EGZ mit jeweils 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml IL-1 β für 24 Stunden. Verwendet wurden die Mittelwerte der relativen IL-6-Erhöhrungen, welche in Bezug zu dem Mittelwert der Kontrollgruppe errechnet wurden. n = 8, 50.000 Zellen pro Kavität, Ctrl = Vehicle/Kontrolle, *** = p<0,001.

3.3 Effekt von Acetylcholin auf die EGZ

3.3.1 Acetylcholin hat keinen Effekt auf die IL-6-Sekretion

In der folgenden Versuchsreihe wurde untersucht, inwiefern die Annahme, dass Acetylcholin über seine Rezeptoren auch eine antiinflammatorische Wirkung hat, auf die EGZ reproduzierbar ist. Dazu stimulierten wir zunächst isolierte EGZ mit dem unselektiven AChR-Agonisten Carbachol, um einen Effekt des Stoffes auf die IL-6-Sekretion zu untersuchen. Hier zeigte sich kein Unterschied der einzelnen Stoffkonzentrationen von Carbachol zu der Kontrollgruppe (Ctrl: $1 \pm 0,12$ vs. Carbachol: 10 nM: $0,99 \pm 0,15$; 100 nM: $1,05 \pm 0,18$; 1 μ M: $0,93 \pm 0,26$; 10 μ M: $1,56 \pm 0,28$, siehe **Abb. 7A**).

In einem weiteren Versuch wurden die isolierten EGZ gleichzeitig mit ATP und Carbachol stimuliert, wobei eine Senkung der IL-6-Sekretion als Zeichen der antiinflammatorischen Wirkung der AChR erwartet wurde. Allerdings blieb dieser Effekt in allen getesteten Dosierungen aus (Ctrl: $1 \pm 0,19$ vs. 100 μ M ATP: $3,55 \pm 0,31$ vs. Carba: 10 nM: $3,07 \pm 0,12$; 100 nM: $3,33 \pm 0,5$; 1 μ M: $2,93 \pm 0,32$; 10 μ M: $2,6 \pm 0,39$, siehe **Abb. 7B**).

Insgesamt hatte die Stimulierung des AChR keinen Einfluss auf die IL-6-Sekretion der

EGZ. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden keine weiteren Versuchsreihen zur Untersuchung des Einflusses von muskarinergen und nikotinergen AChR-Signalwegen durchgeführt.

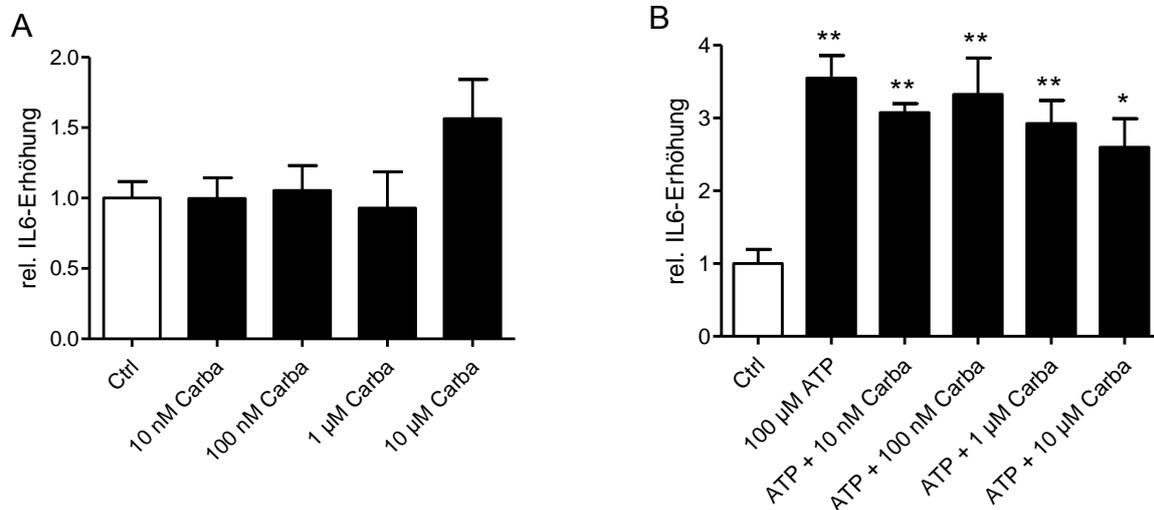


Abb. 7: Einfluss des unselektiven AChR-Agonisten Carbachol auf die IL-6-Produktion von EGZ

(A) Messung der IL-6-Proteinexpression der isolierten EGZ mittels ELISA nach Stimulation mit jeweils 10 nM, 100 nM, 1 µM und 10 µM Carbachol (Carba) für 24 Stunden.

(B) Nachfolgende Messung der IL-6-Proteinexpression mittels ELISA nach simultaner Stimulation der isolierten EGZ mit und ohne Carbachol und 100 µM ATP für 24 Stunden.

Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen IL-6-Erhöhrungen, welche in Bezug zu dem Mittelwert der Kontrollgruppe errechnet wurden. n = 5, 50.000 Zellen pro Kavität. Ctrl = Vehicle/Kontrolle, * = p<0,05, ** p<0,01

3.4 Auswirkungen der Nukleotide auf EGZ

3.4.1 ATP steigert die IL-6-Sekretion in EGZ

Zunächst sollte ein Zusammenhang zwischen der in der Literatur bereits beschriebenen Aktivierung der EGZ durch Nukleotide und der ebenfalls beschriebenen proinflammatorischen Wirkung purinergere Rezeptoren innerhalb gastrointestinaler Entzündungen untersucht werden. Hierfür wurden die isolierten EGZ über 24 Stunden mit jeweils 1 µM, 10 µM und 100 µM des unspezifischen purinergen Agonisten ATP stimuliert. Anschließend wurde die mögliche proinflammatorische und Gliazell-aktivierende Wirkung anhand der Messung der IL-6-Konzentration mittels ELISA untersucht. Es zeigte sich eine Erhöhung der IL-6-Proteinlevel nach Stimulation mit 100 µM ATP (Ctrl: $1 \pm 0,03$ vs. $3,72 \pm 0,33$, siehe **Abb. 8B**), während ein derartiger Effekt nach Stimulation mit niedrigeren

Konzentrationen von ATP ausblieb (1 μM : $1,36 \pm 0,43$; 10 μM : $1,78 \pm 0,58$, siehe **Abb. 8A**).

Zur weiteren Untersuchung spezifischer Subtypen der purinergen Rezeptoren stimulierten wir die isolierten EGZ zusätzlich mit dem selektiven P2Y_{2/4}-Rezeptor-Agonisten UTP γ S und untersuchten dessen Wirkung auf die IL-6-Sekretion der EGZ. UTP γ S hatte unabhängig von der Konzentration keinen Einfluss auf die IL-6-Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ctrl: $1 \pm 0,26$ vs. UTP γ S: 1 μM : $0,75 \pm 0,24$; 10 μM : $1,47 \pm 0,41$; 100 μM : $2,35 \pm 0,87$, siehe **Abb. 8C**), wobei sich bei einer Konzentration von 100 μM UTP γ S ein Trend in der IL-6-Erhöhung andeutete ($p = 0,062$).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine unselektive Stimulation der purinergen Rezeptoren mittels ATP in der höchsten Konzentration von 100 μM eine Zytokinausschüttung der EGZ auslöst. Die P2Y_{2/4}-Rezeptoren spielen dabei vermutlich eine untergeordnete Rolle.

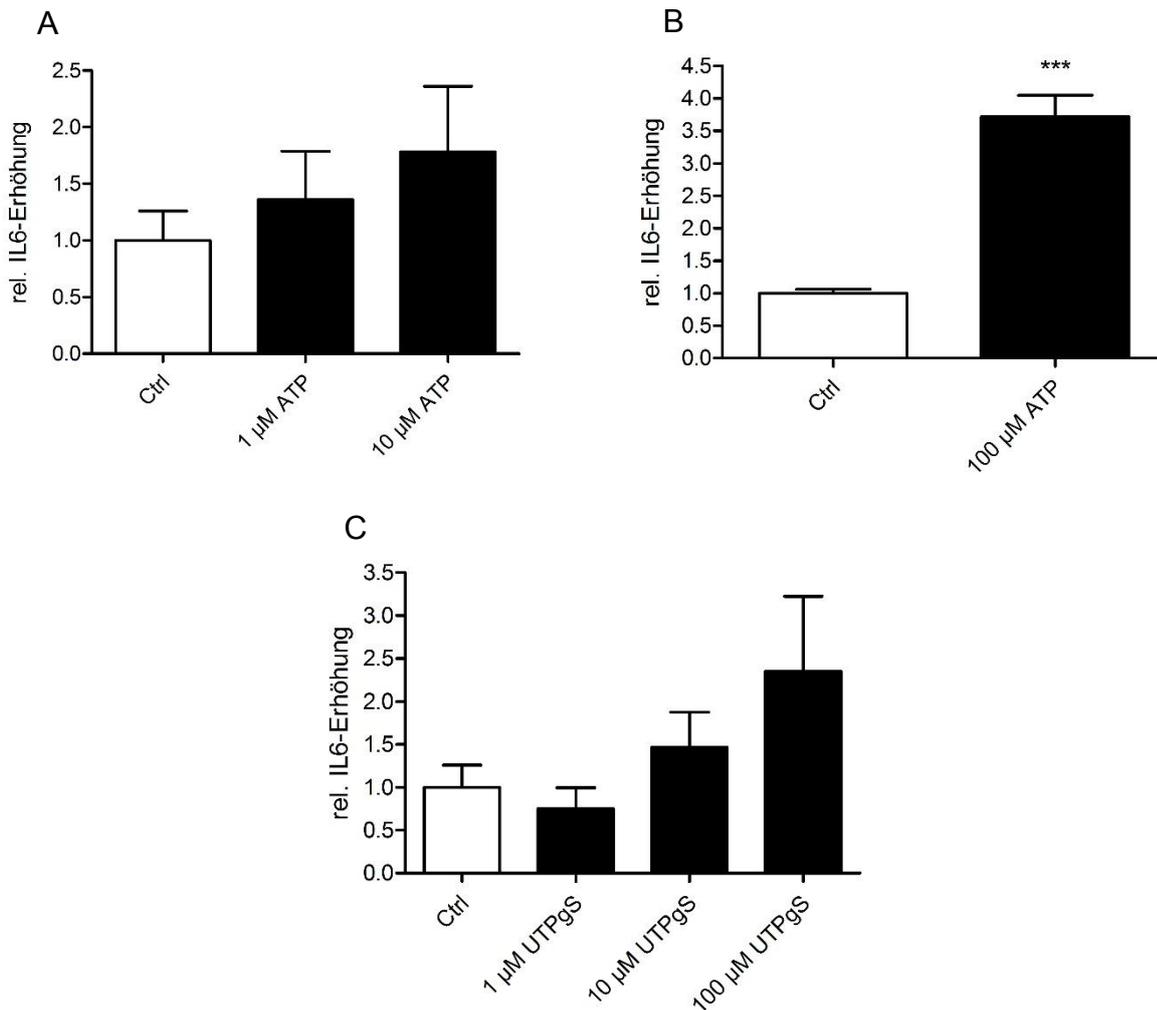


Abb. 8: Einfluss von ATP und UTP γ S auf die IL-6-Produktion von EGZ

(A+B) Messung der IL-6-Proteinexpression der isolierten EGZ mittels ELISA nach Stimulation mit jeweils 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M ATP für 24 Stunden. (Abb. A: n = 5, Abb. B: n = 77).

(C) Messung der IL-6-Proteinexpression der isolierten EGZ mittels ELISA nach Stimulation mit jeweils 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M UTP γ S für 24 Stunden (Abb. C, n = 5).

Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen IL-6-Erhöhungen, welche in Bezug zu dem Mittelwert der Kontrollgruppe errechnet wurden. 50.000 Zellen pro Kavität. Ctrl = Vehicle/Kontrolle, *** = p<0,001.

In einem weiteren Versuch stellten wir die Hypothese auf, dass eine simultane Wirkung der Nukleotide zu einer verstärkten IL-6-Sekretion führen könnte, da die Stimulation mit UTP γ S in hohen Konzentrationen einen Trend zu einer vermehrten IL-6-Sekretion zeigte. Nach simultaner Stimulation der kultivierten EGZ mit 100 μ M ATP und jeweils 1 μ M, 10

μM und $100 \mu\text{M}$ UTP γS konnte eine Steigerung der stimulierenden Wirkung von ATP auf die IL-6-Sekretion beobachtet werden. Dieser Effekt war bei UTP γS -Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ sichtbar ($100 \mu\text{M}$ ATP: $2,68 \pm 0,24$, $10 \mu\text{M}$ UTP γS : $5,46 \pm 0,79$, $100 \mu\text{M}$ UTP γS : $6,83 \pm 0,56$, siehe **Abb. 9**). Zum Vergleich lag die Kontrollgruppe bei einer $1 \pm 0,32$ -fachen IL-6-Erhöhung.

Zusammenfassend bewirkt eine zusätzliche Stimulation der P2Y2/4-Rezeptoren eine Intensivierung der ATP-Wirkung auf die IL-6-Sekretion, welche einen supportiven Einfluss dieser Rezeptoren an der Induktion einer EGZ-Aktivierung möglich macht.

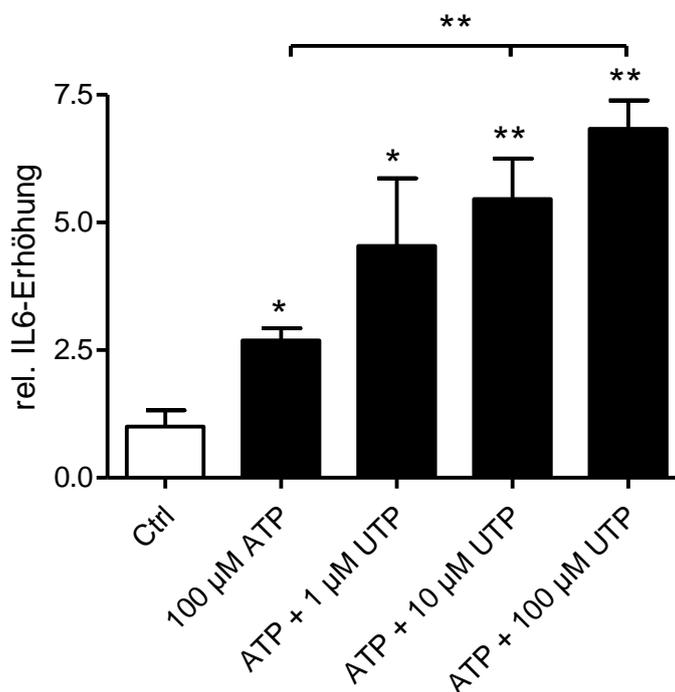


Abb. 9: Einfluss von ATP mit UTP γS auf die IL-6-Produktion von EGZ

Messung der IL-6-Proteinexpression isolierter EGZ mittels ELISA nach Stimulation mit $100 \mu\text{M}$ ATP mit und ohne $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ UTP γS für 24 Stunden. Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen IL-6-Erhöhrungen, welche in Bezug zu dem Mittelwert der Kontrollgruppe errechnet wurden. $n = 5$, 50.000 Zellen pro Kavität. Ctrl = Vehicle/Kontrolle, * = $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Nach Detektion einer IL-6-Signalerhöhung durch die ATP-Stimulation testeten wir anschließend die Spezifität dieser IL-6-Detektion in Hinblick auf die isolierten EGZ unter Verwendung von IL-6-Knock-Out-Mäusen (KO-Mäuse) im Vergleich zu den zuvor verwendeten BL6-Mäusen.

Zusätzlich erfolgte jeweils eine Stimulation der isolierten EGZ der BL6- sowie der KO-Mäuse mit ATP. Der Vergleich zwischen den unterschiedlichen Mausarten zeigte

vergleichbare Ergebnisse ohne Stimulation mit ATP sowie einen fehlenden Effekt nach ATP-Stimulation bei den KO-Mäusen. Die relative IL-6-Erhöhung lag bei beiden Kontrollgruppen und in der KO-Mausgruppe nach ATP-Stimulation jeweils bei Werten um 1, während eine ATP-Stimulation bei den Bl6-Mäusen eine $8,6 \pm 1,6$ -fache Erhöhung der IL-6-Sekretion zeigte (Bl6: Ctrl: $1 \pm 0,29$ vs. IL-6-KO: Ctrl: $1,11 \pm 0,14$; $100 \mu\text{M}$ ATP: $1,1 \pm 0,14$, siehe **Abb. 10**).

Zusammenfassend konnte die Spezifität der IL-6-Detektion gezeigt werden.

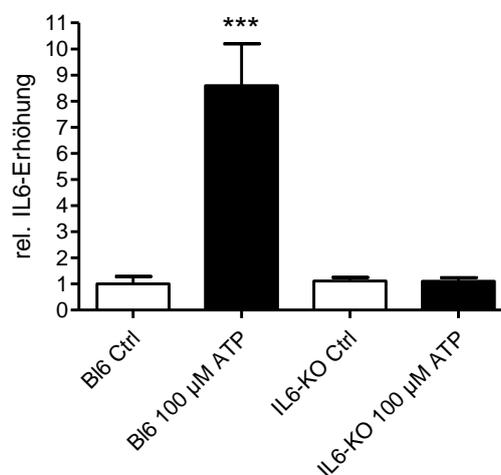


Abb. 10: Einfluss von ATP auf die IL-6-Produktion von EGZ in IL-6-Knock-Out-Mäusen
Messung der IL-6-Proteinexpression isolierter EGZ mittels ELISA der Zellkultur der Bl6- und der IL-6-KO-Mäuse jeweils ohne und nach Stimulation mit $100 \mu\text{M}$ ATP für 24 Stunden. Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen IL-6-Erhöhrungen, welche in Bezug zu dem Mittelwert der Kontrollgruppe errechnet wurden. $n = 5$, 50.000 Zellen pro Kavität. Ctrl = Vehicle/Kontrolle, *** $p < 0,001$.

3.4.2 Nach Stimulation mit ATP ist ein IL-6-Signal immunhistochemisch detektierbar

Die oben beschriebene stimulierende Wirkung von ATP auf die IL-6-Sekretion der EGZ sollte ebenfalls auch mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden. Hierfür wurden isolierte EGZ-Kulturen nach Stimulation mit ATP und anschließender immunhistochemischer Färbung mit einem anti-GFAP- und -IL-6-Antikörper sowie Anfärbung der Zellkerne fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Ziel dieses Versuchs war zusätzlich die Zuordnung der IL-6-Elevation zu den EGZ. Es zeigte sich ein deutliches IL-6-Signal (rot) innerhalb der EGZ (grün) (siehe **Abb. 11 B**). Dieses Signal kumulierte hauptsächlich um den Nukleus (blau) der Zellen. Zum Vergleich war das IL-6-Signal in

den Kontrolldeckgläsern deutlich schwächer bzw. nicht detektierbar (siehe **Abb. 11 A**). Insgesamt zeigte sich hier, dass eine Stimulation mit ATP eine Erhöhung der IL-6-Produktion in den EGZ auslöst.

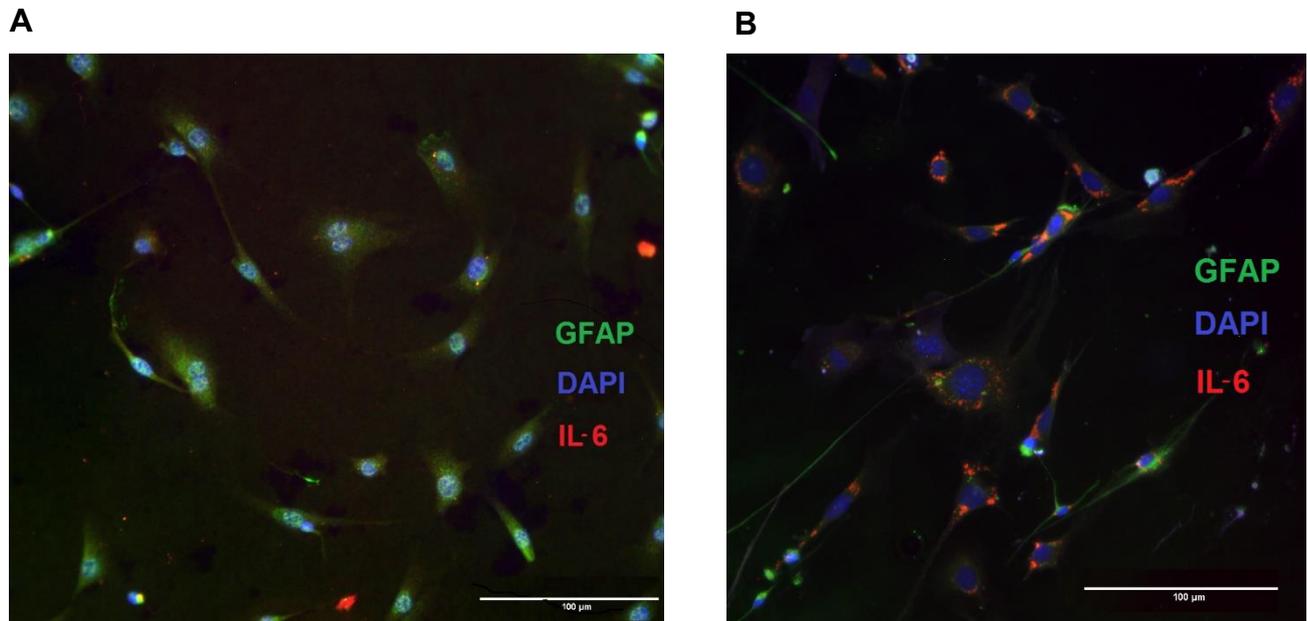


Abb. 11: IL-6-Signal in den EGZ nach ATP-Stimulation
 Immunhistochemische Färbung der Zellkultur der isolierten EGZ ohne Stimulation (A) und nach Stimulation (B) mit 100 μM ATP über 24 Stunden.
 100.000 Zellen pro Deckglas. GFAP = grün, Dapi = blau, IL-6 = rot, Skala = 100 μm

3.5 Effekt von purinergen Rezeptorantagonisten

3.5.1 Die ATP-vermittelte IL-6-Sekretion erfolgt über die P2-Rezeptoren

In der folgenden Versuchsreihe wurde untersucht, ob die stimulierende Wirkung von ATP über die P2-Rezeptorfamilie (P2X und P2Y) erfolgt und ob diese Wirkung durch gezielte Antagonisierung dieser Rezeptoren aufgehoben werden kann.

Dazu wurde der unselektive P2-Rezeptor-Antagonist Suramin zunächst als alleiniger Stimulus und schließlich in Kombination mit 100 μM ATP in einer Dosisreihe auf seine Wirkung auf die isolierten EGZ getestet. Dadurch sollte zusätzlich eine mögliche eigene positive oder negative Wirkung auf die Zytokinausschüttung ausgeschlossen werden.

In der Kontrollgruppe mit alleiniger Suramin-Stimulation zeigte sich unabhängig von der Dosis keine Änderung der IL-6-Ausschüttung im Vergleich zur Kontrolle (Ctrl: $1 \pm 0,28$ vs. Suramin: 0,1 μM: $0,80 \pm 0,24$; 1 μM: $1,39 \pm 0,33$; 10 μM: $0,6 \pm 0,22$; 100 μM: $0,5 \pm 0,1$;

300 μM : $0,68 \pm 0,08$, siehe **Abb. 12A**). In Kombination mit 100 μM ATP konnte schließlich eine Minderung der zuvor gezeigten stimulierenden ATP-Wirkung auf die IL-6-Sekretion bei der höchsten verwendeten Suraminkonzentration von 100 μM gemessen werden (100 μM ATP: $2,84 \pm 0,51$ vs. 100 μM Suramin: $0,99 \pm 0,09$, siehe **Abb 12B**). Niedrigere Konzentrationen von Suramin hatten keinen Einfluss auf die ATP-Wirkung (0,1 μM : $1,99 \pm 0,71$; 1 μM : $2,51 \pm 0,43$; 10 μM : $1,99 \pm 0,42$, siehe **Abb. 12B**). Allerdings kam es nach Stimulation mit ATP in Kombination mit 10 μM Suramin nicht mehr zu einer signifikanten IL-6-Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ctrl: $1 \pm 0,14$, siehe **Abb. 12B**).

Zum Vergleich sollte zusätzlich untersucht werden, ob Suramin auch eine Wirkung auf die Zytokinausschüttung von IL-1 β hat, um eine generelle antiinflammatorische Wirkung des Stoffes zu untersuchen. Dafür wurde die zuvor ermittelte wirksamste Dosis von Suramin (100 μM) mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-1 β kombiniert.

Während ein vorausgegangener Versuch mit Stimulationen von 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml IL-1 β eine Erhöhung der relativen IL-6-Sekretion zur Folge hatte (siehe **Abb. 12D**), war dieser Effekt bei der Stimulation der EGZ mit jeweils 1 ng/ml und 10 ng/ml in Kombination mit 100 μM Suramin nicht mehr reproduzierbar (Ctrl: $1 \pm 0,12$ vs. IL-1 β : 1 ng/ml: $0,81 \pm 0,15$; 10 ng/ml: $1,5 \pm 0,26$, siehe **Abb. 12C**). Eine Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β plus Suramin erbrachte eine Steigerung der IL-6-Sekretion um das $2,18 \pm 0,28$ -fache (siehe **Abb. 12C**). Zum Vergleich kam es bei alleiniger Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β noch zu einer $7,24 \pm 1,31$ -fachen Erhöhung der relativen IL-6-Erhöhung (siehe **Abb. 6**). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Wirkung von ATP antagonisiert werden konnte, sondern dass der unspezifische P2-Rezeptor-Antagonist auch die Wirkung von IL-1 β minderte.

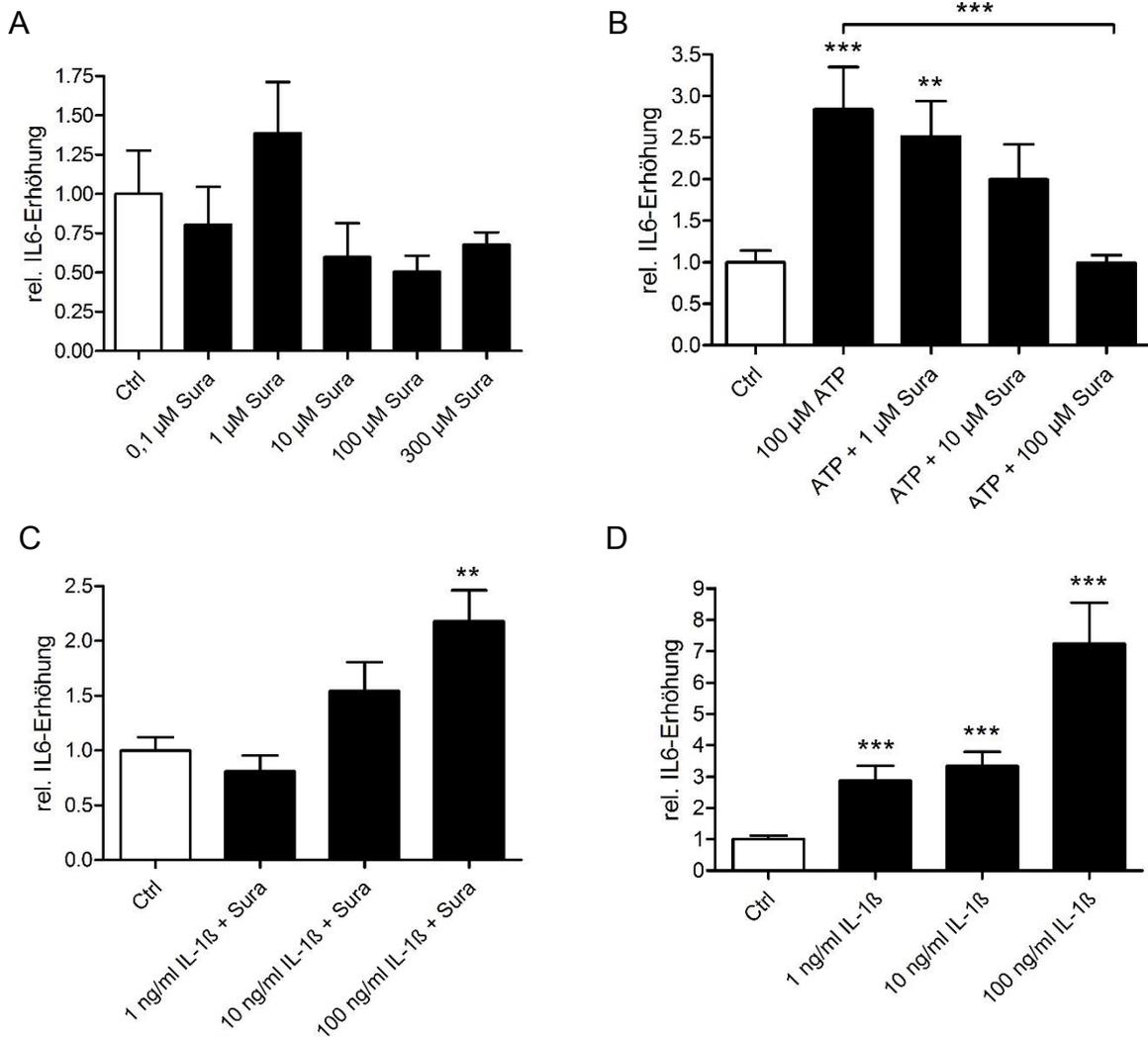


Abb. 12: Einfluss des P2-Rezeptor-Antagonisten Suramin auf die IL-6-Produktion von EGZ

(A) Messung der IL-6-Proteinexpression isolierter EGZ mittels ELISA nach Stimulation mit jeweils 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M und 300 μ M Suramin für 24 Stunden.

(B) Messung der IL-6- Proteinexpression isolierter EGZ mittels ELISA nach simultaner Stimulation mit jeweils 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M Suramin und 100 μ M ATP für 24 Stunden.

(C) Messung der IL-6- Proteinexpression isolierter EGZ mittels ELISA nach simultaner Stimulation mit jeweils 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml IL-1 β und 100 μ M Suramin für 24 Stunden.

(D) Vergleichend zu Abb. C die IL-6- Proteinexpression isolierter EGZ nach alleiniger Stimulation mit jeweils 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml IL-1 β für 24 Stunden.

Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen IL-6-Erhöhrungen, welche in Bezug zu dem Mittelwert der Kontrollgruppe errechnet wurden. n = 5-10, 50.000 Zellen pro Kavität. Ctrl = Vehicle/Kontrolle, Sura = Suramin, ** p<0,01, *** = p<0,001

3.5.2 P2X₇-Rezeptor-Antagonisten hemmen die IL-6-Sekretion nicht

In der nächsten Versuchsreihe der isolierten EGZ sollte ein bestimmter purinerge Rezeptor, der P2X₇-Rezeptor, untersucht werden, da diesem in bisheriger Literatur eine zentrale Rolle bei proinflammatorischen Prozessen zugesprochen wurde. In unserer Versuchsreihe konnte der P2X₇-Rezeptor-Antagonist A740003 die ATP-vermittelte Zytokinausschüttung jedoch nicht hemmen (siehe **Abb. 13B**). Im Gegenteil kam es ab Konzentrationen von 10 µM des Antagonisten in Kombination mit jeweils 100 µM ATP zu einer Erhöhung der IL-6-Sekretion auch im Vergleich zur alleinigen ATP-Stimulation (ATP: $7,03 \pm 0,91$ vs. A740003: 10 µM: $18,39 \pm 4,19$; 30 µM: $18,54 \pm 4,38$, siehe **Abb. 13B**). Die höchste Konzentration von A740003 (30 µM) hatte eine erhöhte IL-6-Sekretion auch ohne simultane Stimulation mit ATP im Vergleich zur Kontrollgruppe zur Folge (Ctrl: $0,91 \pm 0,15$ vs. $5,72 \pm 1,97$, siehe **Abb. 13A**).

Die Wirkung von ATP auf die IL-6-Sekretion ist somit im vorliegenden Versuch nicht über den P2X₇-Rezeptor vermittelt. Vielmehr führt die Hemmung dieses Rezeptors alleine bereits zu einer verstärkten IL-6-Sekretion.

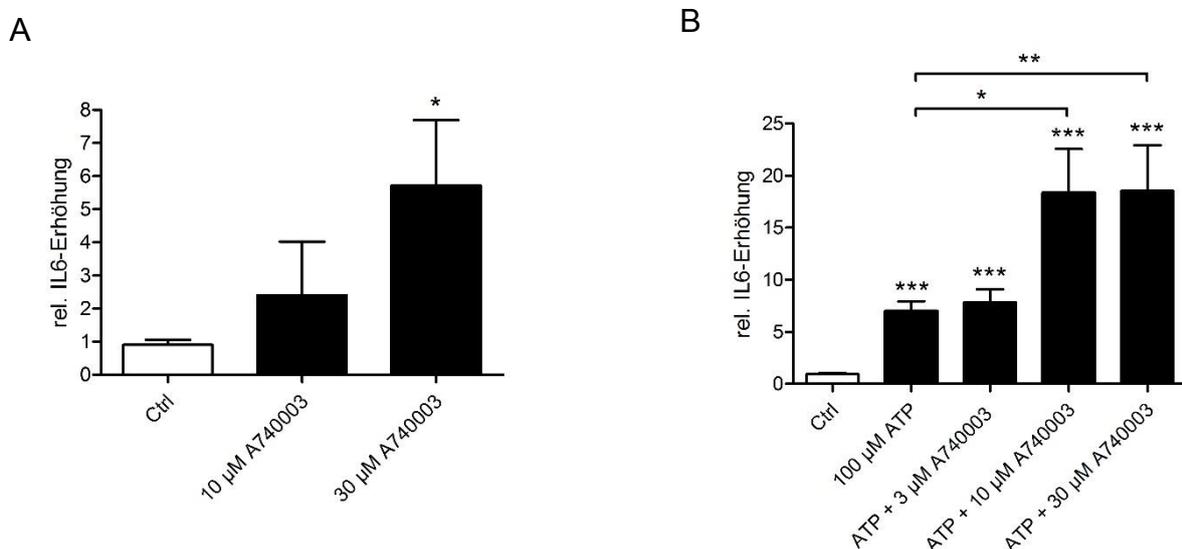


Abb. 13: Einfluss von A740003 auf die IL-6-Produktion von EGZ

(A) Messung der IL-6-Proteinexpression isolierter EGZ mittels ELISA nach Stimulation mit jeweils 10 µM und 30 µM A740003 für 24 Stunden

(B) Messung der IL-6- Proteinexpression isolierter EGZ mittels ELISA nach simultaner Stimulation mit 100 µM ATP und jeweils 3 µM, 10 µM und 30 µM A740003 für 24 Stunden.

Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen IL-6-Erhöhrungen, welche in Bezug zu dem

Mittelwert der Kontrollgruppe errechnet wurden. n = 5-10, 50.000 Zellen pro Kavität. Ctrl = Vehicle/Kontrolle, * = $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

3.6 Effekt von Adenosin-Rezeptor-Agonisten

3.6.1 Die Stimulation des A_{2A} -Rezeptors senkt die IL-6-Sekretion

In dieser Versuchsreihe untersuchten wir die Auswirkung der P1-Rezeptorfamilie auf die IL-6-Sekretion, die zweite Subklasse der purinergen Rezeptoren, sowie deren Hauptliganden Adenosin als Abbauprodukt von ATP. Da eine antiinflammatorische Wirkung des A_3 -Rezeptor-Subtyps sowie des A_{2A} -Rezeptor-Subtyps in Zusammenhang mit den EGZ bereits beschrieben wurde, lag unser Fokus auf diesen Subtypen. Somit untersuchten wir zunächst die Auswirkung des A_{2A} -Rezeptor-Subtyps anhand des spezifischen Agonisten CGS21680 (CGS) auf die IL-6-Sekretion. Hier konnte bereits unabhängig von der verwendeten Konzentration von CGS eine Senkung der IL-6-Ausschüttung über die Hälfte des Wertes der Kontrollgruppe beobachtet werden ((Ctrl: $1 \pm 0,172$ vs. CGS: $0,01 \mu\text{M}$: $0,38 \pm 0,03$; $0,1 \mu\text{M}$: $0,39 \pm 0,04$; $1 \mu\text{M}$: $0,41 \pm 0,04$; $10 \mu\text{M}$: $0,39 \pm 0,04$, siehe **Abb. 14A**).

Anschließend untersuchten wir die Auswirkung des Agonisten auf die ATP-vermittelte IL-6-Sekretion durch simultane Stimulation der isolierten EGZ mit CGS und $100 \mu\text{M}$ ATP. Auch hier konnte eine verminderte IL-6-Sekretion im Vergleich zur alleinigen ATP-Stimulation beobachtet werden, allerdings erst ab Konzentrationen von $0,1 \mu\text{M}$ und $1 \mu\text{M}$ CGS (ATP: $2,13 \pm 0,27$ vs. CGS: $0,1 \mu\text{M}$: $1,04 \pm 0,10$; $1 \mu\text{M}$: $1,59 \pm 0,27$, siehe **Abb. 14B**). Die IL-6-Sekretion durch ATP war insgesamt nach Zugabe von CGS unabhängig von dessen Konzentrationen nicht mehr signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ctrl: $1 \pm 0,17$ vs. CGS: $0,01 \mu\text{M}$: $1,57 \pm 0,4$; $10 \mu\text{M}$: $1,41 \pm 0,19$, siehe **Abb. 14B**).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die IL-6-Sekretion, sei sie ATP-vermittelt oder nicht, über den A_{2A} -Rezeptor-Subtyp gehemmt werden kann.

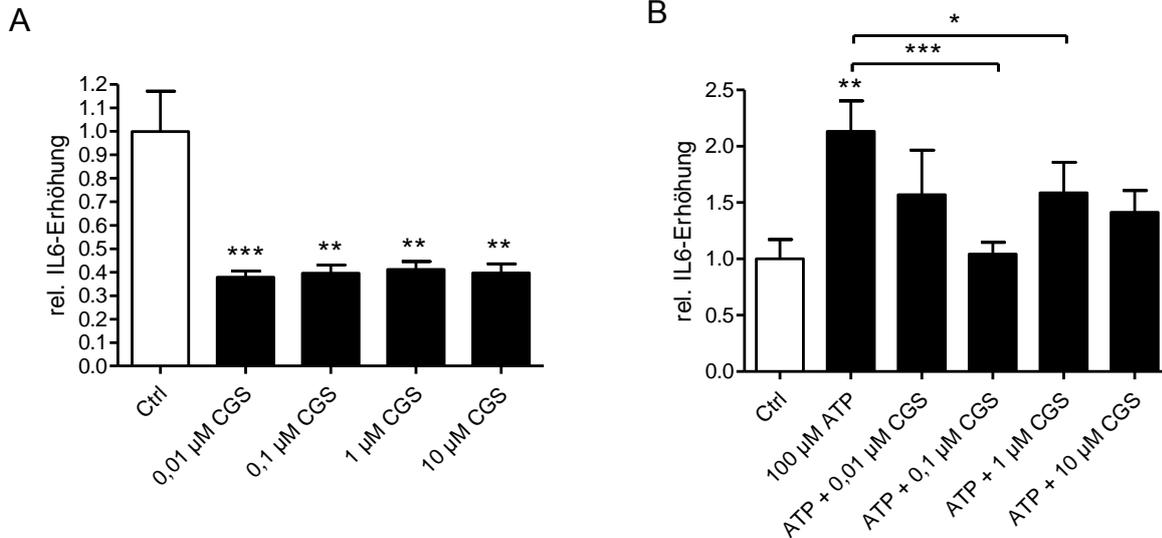


Abb. 14: Einfluss von CGS21680 auf die IL-6-Produktion von EGZ

(A) Messung der IL-6-Proteinexpression isolierter EGZ mittels ELISA nach Stimulation mit 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM und 10 µM CGS für 24 Stunden

(B) Messung der IL-6-Proteinexpression isolierter EGZ mittels ELISA nach simultaner Stimulation mit CGS und 100 µM ATP für 24 Stunden.

Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen IL-6-Erhöhrungen, welche in Bezug zu dem Mittelwert der Kontrollgruppe errechnet wurden. n = 8-10, 50.000 Zellen pro Kavität. Ctrl = Vehicle/Kontrolle, * = p<0,05, ** p<0,01, *** = p<0,001

3.6.2 Die Stimulation des A₃-Rezeptors erhöht die ATP-vermittelte IL-6-Sekretion

Die zweite Versuchsreihe untersuchte die Auswirkung des A₃-Rezeptor-Subtyps, dessen Stimulation in Zusammenhang mit einer verminderten IL-6-Messung in der Literatur bereits beschrieben wurde. Hier zeigte sich nach Stimulation der Zellkultur mit dem spezifischen A₃-Rezeptor-Agonisten 2-Cl-IBMeca (IBMeca) keine Änderung der IL-6-Ausschüttung verglichen mit der Kontrollgruppe (Ctrl: 1 ± 0,14 vs. IBMeca: 0,2 µM: 1,47 ± 0,27; 2 µM: 0,87 ± 0,12; 20 µM: 1,26 ± 0,46, siehe **Abb. 15A**). In Kombination mit 100 µM ATP in einer nachfolgenden Versuchsreihe zeigte sich in der Gruppe der niedrigsten Konzentration von IBMeca (0,2 µM) sogar eine Erhöhung der ATP-vermittelten IL-6-Ausschüttung (0,2 µM IBMeca: 4,19 ± 0,68; 100 µM ATP: 2,65 ± 0,4, siehe **Abb. 15B**). In der Gruppe der höchsten verwendeten Konzentration von IBMeca (20 µM) konnte der Effekt von ATP von einer 2,65 ± 0,4-fachen Erhöhung auf eine 1,81 ± 0,69-fache Erhöhung von IL-6 vermindert werden (siehe **Abb. 15B**). Die ATP-vermittelte IL-6-Ausschüttung war damit im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht mehr erhöht. Dieser Effekt war jedoch nicht

signifikant im Vergleich zur alleinigen ATP-Stimulation. Es zeigte sich lediglich ein Trend ($p = 0,062$). Diese Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass die ATP-vermittelte IL-6-Sekretion durch einen niedrig dosierten A_3 -Rezeptor-Agonisten erhöht wird. Ab höheren Konzentrationen des Agonisten wird eine Hemmung der ATP-Wirkung auf die IL-6-Sekretion angedeutet, was die bereits in der Literatur beschriebenen gegensätzlichen Wirkungen des Rezeptors bekräftigt.

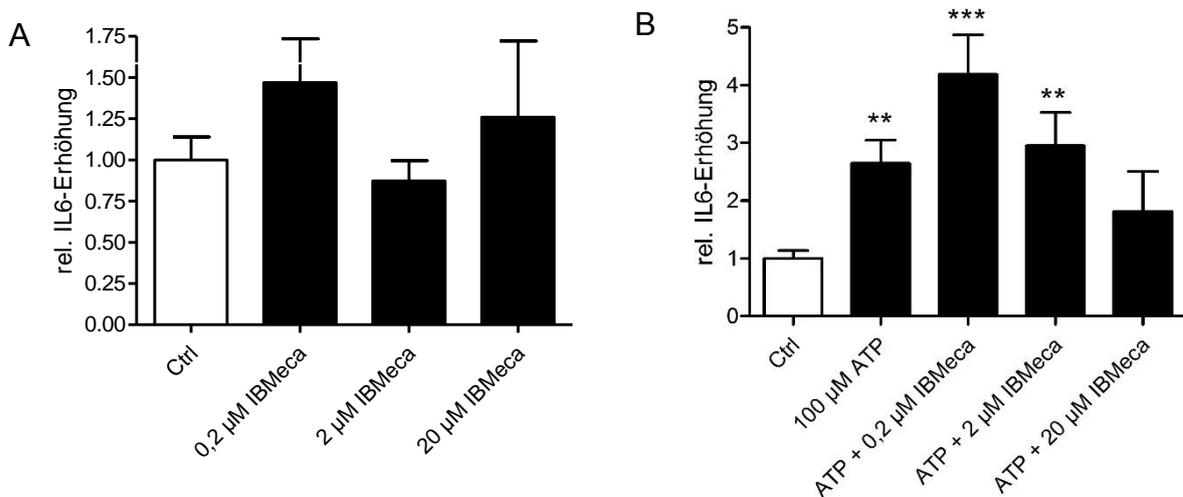


Abb. 15: Einfluss von 2-Cl-IBMeca auf die IL-6-Produktion von EGZ

(A) Messung der IL-6-Proteinexpression isolierter EGZ mittels ELISA nach Stimulation mit 0,2 µM, 2 µM und 20 µM IBMeca für 24 Stunden

(B) Messung der IL-6-Proteinexpression isolierter EGZ mittels ELISA nach simultaner Stimulation mit IBMeca und 100 µM ATP für 24 Stunden.

Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen IL-6-Erhöhrungen, welche in Bezug zu dem Mittelwert der Kontrollgruppe errechnet wurden. $n = 15$, 50.000 Zellen pro Kavität. Ctrl = Vehicle/Kontrolle, ** $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

3.7 Zusammenfassung

Zusammenfassend bewirkte eine unspezifische Stimulation der P2-Rezeptoren der isolierten EGZ mittels ATP eine Erhöhung der IL-6-Sekretion. Die Wirkung von ATP war hier nicht vermittelt über den $P2X_7$ -Rezeptor. Die ATP-vermittelte IL-6-Sekretion konnte über die Stimulation des A_{2A} -Rezeptors gesenkt werden.

Die Stimulation der cholinergen Rezeptoren hatte keinerlei Effekt auf die IL-6-Sekretion der EGZ.

4. Diskussion

Akute infektiöse Kolitiden können alle Altersgruppen betreffen und bedeuten vor allem im Klinikalltag häufig einen finanziellen und personellen Mehraufwand durch Isolationsmaßnahmen oder Ausbruchsgeschehen. Während diese akuten Entzündungsgeschehen zumeist durch symptomatische und selten auch, abhängig von dem jeweiligen Erreger, antiinfektiöse Therapie in der westlichen Welt gut behandelt werden können, stoßen die therapeutischen Möglichkeiten bei den CED häufig an ihre Grenzen. Die Inzidenz der CED ist in der westlichen Welt durch die Industrialisierung steigend (Zhao et al., 2021). Die Pathogenese ist dabei noch nicht gänzlich geklärt und neben medikamentösen Maßnahmen wie Corticosteroiden und Antikörpertherapien sind häufig auch operative Therapien wie Teilresektionen betroffener Darmabschnitte notwendig. Im Krankheitsverlauf kommt es neben extraintestinalen Symptomen häufig zu psychischen Belastungen mit starkem Leidensdruck. Ein Weg zum besseren Verständnis dieser Erkrankungen und zur Entwicklung neuer Therapiestrategien ist daher dringend erforderlich.

In der Literatur der letzten Jahre rückten die EGZ in den Fokus der Forschungen zu therapeutischen Ansätzen entzündlicher Geschehen des GI-Traktes (Grubišić et al., 2020; Schneider et al., 2021; Sharkey, 2015). Ihre Teilhabe an inflammatorischen Prozessen ist mittlerweile unumstritten, allerdings ist noch offen, wie genau ihre Rolle zu definieren ist, denn es wurden sowohl inhibitorische als auch exzitatorische Wirkungen auf inflammatorische Vorgänge beschrieben (Stakenborg et al., 2022; Progatzyk et al., 2021; Langness et al., 2017). So bleibt unklar, ob die EGZ den Verlauf von inflammatorischen Vorgängen positiv und/oder negativ beeinflussen und was ein ausschlaggebender Faktor hierfür sein könnte.

Allerdings konnten eine Vielzahl von grundlegenden Untersuchungen Signalwege offenlegen, die in verschiedenen akuten und chronischen pathologischen Vorgängen des GI-Traktes eine Rolle spielen, was Wege zur Entwicklung therapeutischer Strategien ebnet. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit in den Kontext aktueller wissenschaftlicher Arbeiten gesetzt, wobei neben den Ergebnissen zunächst auch die Methodik dieser Arbeit diskutiert wird.

4.1 Schwankungen in der Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Zellkulturgewinnung konnte lediglich einen Anteil der EGZ an der Gesamtzahl der vorliegenden Zellen von 50-60 % erzielen (siehe **Abb. 5**). Dieser Anteil wurde mittels GFAP-Signal als Marker für die EGZ ermittelt. Dies war der einzige Marker zur Identifizierung der EGZ in dieser Arbeit, da GFAP in der Literatur in Zusammenhang mit der aktivierten Gliazelle innerhalb entzündlicher Vorgänge stand und zum Zeitpunkt der Arbeit einen der gängigen Marker darstellte (siehe **Kap. 1.1.2** und **1.1.4**). S100B als weiterer Marker war lediglich in whole-mount-Präparaten nachweisbar, jedoch in unseren Zellkulturpräparaten kaum ersichtlich und eignete sich daher als Gliazellmarker in dieser Arbeit nicht (siehe **Abb.1**). Zur Identifizierung sind mittlerweile jedoch weitere Marker wie SOX-10 oder PLP-1 verfügbar und etabliert. Zusätzlich gibt es die Möglichkeit neben der Immunhistochemie mittels quantitativer PCR eine genauere Analyse bestimmter Marker durchzuführen. Diese zusätzlichen Möglichkeiten der Identifizierung und der Analyse wurden bereits in vielen wissenschaftlichen Arbeiten angewendet (Schneider et al., 2022; Schneider et al., 2021). So ist auch die Reinheitsbestimmung einer Zellkultur valider.

Neben der Reinheit der Zellkultur war eine weitere Variable die Funktionsfähigkeit der EGZ, die möglicherweise durch die Methodik der Kulturgewinnung beeinträchtigt wurde. Durch die Methode konnte nicht zuverlässig ermittelt werden, wie viele der Zellen nach der Verarbeitung noch intakt, proliferationsfähig und hinsichtlich Zytokinproduktion funktionsfähig waren. Dadurch entstanden Schwankungen innerhalb der Zellkulturen, die sich unter anderem in der statistischen Auswertung bemerkbar machten. Es zeigten sich größere Schwankungen innerhalb einer Stimulationsgruppe im Sinne einer größeren Standardabweichung. Dabei sind mittlerweile validere Methoden der Zellkulturgewinnung sowie der Identifizierung der EGZ in der Forschung etabliert, die genauere Analysen möglich machen.

Ein Beispiel ist die Herstellung sogenannter *Neurospheres*, eine Kultur aus Clustern aus neuronalen Stammzellen, die nach Beendigung der Laborarbeiten zu dieser Arbeit in unserem Labor etabliert wurde (Schneider et al., 2021). Hier wird analog zur Gliazell-Isolation wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, die Muscularis externa präpariert, jedoch nach Verdau in ein Proliferations-Medium speziell für neuronale Zellen gegeben. Nach längerer Inkubationszeit konnte so eine Zellkultur mit einem Anteil von durchschnittlich 85 % GFAP-

positiven EGZ erreicht werden. Zusätzlich konnte eine höhere Proliferationsrate erreicht werden, sodass eine größere Zellkultur aus einem präparierten Mäuse-Dünndarm entstand. Nachfolgende Versuche erzielten so eindeutigere Ergebnisse.

Neben der morphologischen Heterogenität (siehe **Abb. 4**) und Schwankungen in der Zellkultur war dennoch eine in der Literatur beschriebene IL-6-Sekretion reproduzierbar. Stoffels et al. beschrieb bereits 2014 eine signifikante IL-6-Sekretion durch EGZ nach Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β (Stoffels et al., 2014). Ein Zehntel dieser Konzentration hatte bereits eine vergleichbare Wirkung auf unsere kultivierten EGZ mit einem hohen Signifikanzlevel ($p < 0,001$, siehe **Abb. 6**). 100 ng/ml konnten die Zytokinausschüttung sogar mehr als verdoppeln von einer ca. 3,4-fachen nach Stimulation mit 10 ng/ml auf eine 7,2-fache Erhöhung nach 100 ng/ml IL-1 β (siehe **Abb. 6**).

Immunhistochemisch konnte zudem ein IL-6-Signal in den EGZ detektiert werden (siehe **Abb. 11**), sodass wir davon ausgehen können, dass die Elevation des Zytokins auf eine höhere Sekretion aus den EGZ zurückzuführen ist. Somit lässt sich sagen, dass die kultivierten EGZ trotz morphologischer Unterschiede und im Vergleich zu heutigen Arbeiten geringem Anteil an der Zellkultur eine messbare IL-6-Produktion nach Stimulation erzeugen und somit ihre Funktionsfähigkeit in gewissem Maße gegeben ist. Dennoch stellt die oben beschriebene Zellkultur aus Neurospheres sowie die zusätzliche Identifizierung und Analyse der Zellen mittels Genanalyse eine validere Methode in der heutigen Forschung dar.

4.2 Purinerge Aktivität bei inflammatorischen Vorgängen

4.2.1 Proinflammatorischer Effekt

In unseren Versuchsreihen konnte ein stimulatorischer Effekt von ATP auf die IL-6-Sekretion gezeigt werden. Dieser wird in aktueller Literatur mehrfach bestätigt, wobei mittlerweile weitergehende Untersuchungen die möglichen Rezeptoren, die an diesem Effekt mitbeteiligt sind, eingrenzen konnten (Schneider et al., 2021). Mittels verschiedener Antagonisten und spezifischer Agonisten konnten, wie auch in dieser Arbeit die P1-Rezeptoren als maßgebliche Rezeptoren für die IL-6-Sekretion mittlerweile ausgeschlossen werden, da eine erhöhte Zytokinausschüttung ausblieb (Schneider et al., 2021).

Weitere Ergebnisse dieser Arbeit schlossen eine P2Y_{2/4}-vermittelte IL-6-Sekretion

ebenfalls aus (siehe **Kap. 3.4.1**). In aktueller Literatur konnte passend dazu mittels P2-Rezeptor-mRNA-Profilbestimmung muriner EGZ eine deutlich höhere Genexpression von P2X₇-, -₄- und -₂-Rezeptoren festgestellt werden, die die Expression von P1- und P2Y-Rezeptoren überstieg, was den Fokus auf die P2X-Rezeptorsubtypen lenkte (Schneider et al., 2021).

In dieser Arbeit wurden ebenfalls die P2-Rezeptoren als Mediator für die IL-6-Sekretion untersucht, wobei eine unspezifische Antagonisierung des Effektes gelang (siehe **Kap. 3.5.1**). Das Ergebnis war eine dosisabhängige Hemmung der ATP-Wirkung mit hohem Signifikanzlevel bei der höchsten Konzentration von 100 µM des unspezifischen Antagonisten ($p < 0,001$). Somit ergab sich, wie auch in aktueller Literatur beschrieben, eine Zytokinausschüttung, die über purinerge Rezeptoren vermittelt wurde.

Diese hemmende Wirkung auf die Zytokinausschüttung konnte auch bei der Stimulation mit IL-1 β beobachtet werden, während die alleinige Stimulation der EGZ mit dem Antagonisten keine Wirkung hatte (siehe **Abb. 12 A und C**). Der verwendete Stoff Suramin hat neben der unspezifischen Antagonisierung der P2-Rezeptoren auch noch einige weitere Funktionen. So hemmt es die Bindung von verschiedenen Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren, wirkt als kompetitiver GABA_A-Rezeptor-Antagonist, erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit von Ryanodin-Rezeptoren (RyR) und wirkt auch als antikrebs- und antiparasitäres Mittel (Li et al., 2015; Alyoussef, 2014; Hohenegger et al., 1996; Luo et al., 2018). Zusätzlich wird in aktueller Literatur eine hemmende Wirkung des Stoffes auf die proinflammatorischen Signalwege von IL-1 β beschrieben, sodass unser Ergebnis durchaus in diesem Kontext zu sehen ist (Zi-Miao Liu et al., 2021).

Darauffolgende Experimente mit spezifischer Antagonisierung des P2X₇-Rezeptors, dem in der Literatur ein proinflammatorischer Effekt nachgesagt wird, hatten keine Auswirkung auf die Zytokinproduktion (siehe **Abb. 13**). Dieser Rezeptor war somit gemäß unseren Ergebnissen nicht verantwortlich für die ATP-vermittelte IL-6-Sekretion. Als hauptsächlich verantwortlich für entzündliche Geschehen in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wird er dennoch gesehen, wobei die Expression und Funktion vor allem in klassischen Immunzellen betrachtet wurde (Di Virgilio et al., 2017; Burnstock et al., 2017). Die proinflammatorische Rolle des Rezeptors ist Gegenstand aktueller Forschung, nicht nur in akuten entzündlichen Geschehen, sondern unter anderem auch

bei neurodegenerativen Erkrankungen und im Rahmen von Tumorprogress (Burnstock und Knight, 2018; Francistiová et al., 2020).

Die fehlende Auswirkung auf die IL-6-Sekretion der EGZ nach Antagonisierung konnte in aktueller Literatur schließlich ebenfalls bestätigt werden. Weiter noch konnte nach Ausschluss der Beteiligung des P2X₄-Rezeptors, der P2X₂-Rezeptor als verantwortlicher Rezeptor für die ATP-vermittelte IL-6-Sekretion detektiert werden (Schneider et al., 2021). Die Ursache für die in dieser Arbeit ermittelte Erhöhung der IL-6-Sekretion nach Antagonisierung des P2X₇-Rezeptors bleibt jedoch unklar. So konnte der Antagonist die Wirkung von ATP signifikant verstärken und auch die alleinige Stimulation mit dem Antagonisten A740003 erzielte eine signifikante Erhöhung der Zytokinausschüttung auf das 5-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe **Abb. 13 A und B**). Zu diskutieren ist hier die Möglichkeit, dass dieser Rezeptor das wirksame ATP teilweise bindet und so nur eine gewisse Restwirkung des Nukleotids die Zytokinausschüttung bewirkt. Eine Antagonisierung des Rezeptors würde somit mehr ATP freigeben und eine stärkere Wirkung auf die Zytokinausschüttung erklären.

Fraglich bleibt, warum eine alleinige Stimulation der EGZ mit dem Antagonisten bereits eine höhere Zytokinausschüttung auslöst. Eine antiinflammatorische Wirkung wird dem P2X₇-Rezeptor in der Literatur bisher nicht zugesprochen (Wareham, 2016; Gulbransen et al., 2012; Di Virgilio et al., 2017).

Zusammenfassend konnten die P2-Rezeptoren als verantwortlich für die ATP-vermittelte IL-6-Sekretion erarbeitet werden, wobei der genaue Subtyp zum Zeitpunkt der Arbeit nicht eruiert werden konnte. Mittlerweile konnte der P2X₂-Rezeptor als verantwortlicher Rezeptor durch Schneider et al. durch Verbesserung der Methodik und Etablierung spezifischer Antagonisten detektiert werden. In dieser Arbeit war dies aufgrund fehlender Verfügbarkeit dieser Antagonisten noch nicht möglich.

Durch die Identifizierung des Subtyps des Rezeptors bieten sich nun neue Möglichkeiten des therapeutischen Ansatzes, auf die ich in den nachfolgenden Kapiteln näher eingehen werde.

4.2.2 Antiinflammatorischer Effekt

Der zweite Versuchsteil befasste sich mit dem weiteren Subtyp der purinergen Rezeptoren, den P1-Rezeptoren, die über Adenosin, ein Abbauprodukt von ATP, stimuliert

werden und denen vor allem ein antiinflammatorischer und regulierender Effekt zugesprochen wird (Antonioli et al., 2022, Pasquini et al., 2021). Die Stimulation eines Subtyps dieser Rezeptoren, des A_{2A} -Rezeptors, bewirkte passend hierzu eine Hemmung der ATP-vermittelten IL-6-Sekretion (siehe **Kap. 3.6.1**), konnte jedoch auch ohne Kostimulation mit ATP die IL-6-Sekretion bereits hemmen. Diesem Rezeptor wird in aktueller Literatur eine antiinflammatorische Wirkung durch Suppression von beispielsweise Zytokinen wie IL-12, TNF und IFN- γ zugesprochen und therapeutische Möglichkeiten durch Agonisierung dieses Rezeptors wurden bereits am Mausmodell erfolgreich getestet (Antonioli et al., 2018). Als weiterer Rezeptor wurde der A_3 -Rezeptor mittels Agonisten getestet. Hier zeigte sich ebenfalls eine antiinflammatorische Wirkung durch Hemmung der ATP-vermittelten IL-6-Sekretion, jedoch erst ab der höchsten verwendeten Konzentration des Agonisten IBMeca (siehe **Abb. 15 A und B**). In niedrigeren Konzentrationen zeigte sich überraschend eine Erhöhung der ATP-vermittelten IL-6-Sekretion. Da der K_i -Wert (Dissoziationskonstante) von IBMeca für den A_3 -Rezeptor bei 1,1 nM liegt, was auf eine sehr hohe Spezifität deutet, darf vermutet werden, dass die Effekte der hohen Dosierung möglicherweise als *off-target* zu werten sind und nicht über den A_3 -Rezeptor vermittelt werden. In der Literatur sind zudem gegensätzliche Wirkungen dieses Rezeptors beschrieben. So konnte einerseits eine Verminderung der Entzündungszeichen nach chemisch-induzierter Kolitis durch den Agonisten IBMeca gezeigt werden (Guzman et al., 2006), andererseits zeigte sich jedoch nach funktioneller Ausschaltung des A_3 -Rezeptors in Mäusen eine Abschwächung der Kolitis nach chemischer Reizung (Ren et al., 2011). Eine genaue Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse ist auch hier unklar, wobei unterschiedliche Untersuchungsbedingungen diskutiert werden (Antonioli et al., 2019).

Zusätzlich ist die verwendete maximale Konzentration von IBMeca zu überdenken. In Experimenten zur Auswirkung von IBMeca auf den Zelltod von EGZ nach Behandlung mit Clostridium-difficile-Toxin wurde eine Konzentration von 30 μ M IBMeca verwendet, während in dieser Arbeit maximal 20 μ M IBMeca verwendet wurden, wonach der Zelltod der EGZ minimiert werden konnte (Costa et al., 2022). Auch hier bleibt jedoch die Spezifität bezüglich des A_3 -Rezeptors fraglich, da die eingesetzten Dosierungen weiter oberhalb des K_i -wertes von 1,1 nM liegen.

Die aktuelle Forschung befasst sich bereits mit Studien zu spezifischen A_3 -Rezeptor-

Agonisten als therapeutisches Mittel bei autoimmunen Erkrankungen wie der Psoriasis vulgaris und der rheumatoiden Arthritis (Jacobson et al., 2018) aber auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Antonioli et al., 2020).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass anhand dieser Versuche ein negativer Feedback-Mechanismus innerhalb des purinergen Systems sichtbar wurde, indem die proinflammatorische Wirkung von ATP durch dessen Abbauprodukt Adenosin über den A_{2A} -Rezeptor suffizient gehemmt werden konnte. Die in der Literatur zuvor beschriebenen Effekte der einzelnen Adenosinrezeptoren ließen sich auch hier reproduzieren, wobei der A_{2A} -Rezeptor anders als der A_3 -Rezeptor auch unabhängig von ATP eine antiinflammatorische Wirkung im Sinne einer IL-6-Hemmung aufwies. Dabei scheint der Abbau von ATP zu Adenosin in der Frühphase der Stimulation keine signifikante Rolle zu spielen, da die alleinige Stimulation von ATP auch nach 24 Stunden weiterhin eine erhöhte IL-6-Konzentration bewirkte. In dieser Arbeit konnte nicht eruiert werden, ob es im längeren zeitlichen Verlauf auch ohne Hinzugabe der Adenosin-Agonisten zu einem Abfall der ATP-Wirkung kommt, welche durch Abbau des Stoffes selbst über die Ektonukleotidasen mit daraus resultierender Erhöhung von Adenosin erklärbar wäre, wie sie bereits in der Literatur beschrieben wurde (Robson et al., 2006; Silva-Vilches et al., 2018). Allerdings ist hierfür eine stabilere Zellkultur nötig, um im zeitlichen Verlauf vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Zusätzlich ist eine Untersuchung der anderen P1-Rezeptor-Subtypen in Hinblick auf die antiinflammatorische Wirkung sinnvoll. Dem A_{2B} -Rezeptor konnte in aktuellen Untersuchungen bereits eine antiinflammatorische Wirkung auf murinen EGZ nachgewiesen werden (D'Antongiovanni et al., 2020a). Dem A_1 -Rezeptor spricht man ebenfalls immunmodulatorische Wirkungen zu, wobei seine genaue Wirkung auf die EGZ noch unklar ist (D'Antongiovanni et al., 2020b; Antonioli et al., 2022).

Aufgrund von Materialmangel und Zeitaufwand konnte die Untersuchung der anderen P1-Rezeptor-Subtypen in dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

4.3 Cholinerge Aktivität bei inflammatorischen Vorgängen

Die zweite Rezeptorgruppe, die untersucht werden sollte, waren die cholinergen Rezeptoren, denen in der Literatur einheitlich eine antiinflammatorische Wirkung zugesprochen wird (Shao et al., 2019; Ruzafa et al., 2021; Chow und Gulbrandsen, 2017).

Ihre Funktionen umfassen unter anderem die Hemmung der Ausschüttung bestimmter Zytokine und die Erhaltung der intestinalen epithelialen Barriere.

Diese inhibitorische Wirkung auf das Immunsystem konnte in dieser Arbeit mittels unselektiver Stimulation durch einen ACh-Rezeptor-Agonisten in der EGZ-Kultur jedoch nicht reproduziert werden. Nach alleiniger Stimulation zeigte sich keine Änderung in der Zytokinausschüttung im Vergleich zur Kontrolle (siehe **Abb. 7A**). Auch war keine signifikante Inhibition der ATP-Wirkung detektierbar (siehe **Abb. 7B**), wie sie bereits in der Literatur anhand anderer Zellarten beschrieben wird (Matteoli et al., 2014; Goverse et al., 2016).

Aufgrund fehlender Hinweise darauf, dass ACh einen vergleichbaren inhibitorischen Effekt auf ATP in den EGZ hat, brachen wir diese Versuchsreihe ab.

Aktuell ist der antiinflammatorische Effekt der cholinergen Rezeptoren auf EGZ beispielsweise durch die Inhibition der Transkription des proinflammatorischen Stoffes NF- κ B beschrieben (Chow und Gulbransen, 2017). Ein Zusammenhang zwischen den cholinergen Rezeptoren und der IL-6-Sekretion von EGZ wurde noch nicht beschrieben. Zu sagen ist, dass solch ein Zusammenhang bei anderen Zellarten durchaus besteht. So führte eine Stimulation dieser Rezeptoren unter anderem zu einer verminderten IL-6-Sekretion von Makrophagen (Ruzafa et al., 2021). Die antiinflammatorische Wirkung der cholinergen Rezeptoren von EGZ könnte über die Hemmung anderer inflammatorischer Signalwege und Zytokine erfolgen. Zur näheren Untersuchung des Zusammenhangs der cholinergen Rezeptoren und der ATP-vermittelten Zytokinausschüttung ist ein Wechsel des zu detektierenden, proinflammatorischen Stoffes notwendig.

Eine weitere Erklärung für die fehlende Wirkung könnte auch ein stärkerer proinflammatorischer Effekt durch ATP sein, der den cholinergen Effekt überlagert. So konnte die Stimulation cholinergischer Rezeptoren auf EGZ die ATP-vermittelte Neurodegeneration beispielsweise ebenfalls nicht verhindern (Delvalle et al., 2018).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine inhibitorische Wirkung der cholinergen Rezeptoren speziell bei der IL-6-Sekretion in den kultivierten EGZ nicht nachweisbar war. Eine generelle fehlende antiinflammatorische Wirkung der cholinergen Rezeptoren auf den EGZ ließ sich damit allerdings nicht gänzlich ausschließen und konnte mittlerweile durch aktuelle Forschung sogar nachgewiesen werden (Chow und Gulbransen, 2017).

4.4 Ausblick: die EGZ als möglicher Regulator intestinaler Entzündungsvorgänge

Zusammenfassend ließen sich anhand der purinergen Rezeptoren die zuvor beschriebenen gegensätzlichen Effekte der EGZ, die pro- und antiinflammatorischen, auch in dieser Arbeit bestätigen. Neben signifikanten Steigerungen der Zytokinausschüttung durch ATP ließ sich dieser Effekt auch deutlich durch Antagonisten bzw. durch Adenosin, das Abbauprodukt von ATP, aufheben (siehe **Abb. 12, 14 und 15**). Ein Regelkreis innerhalb der EGZ, der inflammatorische Prozesse zur Abwehr schädigender Einflüsse begünstigt bzw. limitiert, ist damit wahrscheinlicher, sodass die Beschreibung der Zelle als rein pro- bzw. antiinflammatorisch unzulänglich wäre.

Die Entwicklung gezielter therapeutischer Möglichkeiten ist Gegenstand aktueller Forschung, wobei die purinergen Rezeptoren hier eine zentrale Rolle einnehmen. Eine der möglichen Zielstrukturen innerhalb der purinergen Rezeptoren konnte bereits identifiziert werden. So wurde Ambroxol als P2X₂-Rezeptor-Antagonist am Mausmodell getestet mit dem Ergebnis geringerer Entzündungsaktivität nach Reizung des Colons (Schneider et al., 2021).

Dies zeigt erneut die essentielle Bedeutung der EGZ innerhalb entzündlicher Vorgänge und die therapeutischen Möglichkeiten, die sich aus der Erforschung der inflammatorischen Signalwege ergeben.

5. Zusammenfassung

Akute und chronische Entzündungen des Gastrointestinaltraktes (GI-Traktes) spielen unter anderem in internistischen und viszeralchirurgischen Abteilungen eine zentrale Rolle, wobei vor allem die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) Patienten und Behandler oft vor therapeutische Herausforderungen stellen. Die enterischen Gliazellen (EGZ) rückten in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung entzündlicher Vorgänge des GI-Traktes. Ihnen werden in der Literatur als „aktivierte EGZ“ sowohl anti- als auch proinflammatorische Einflüsse zugeschrieben. Sie schützen einerseits den Darm vor schädigenden Einflüssen, indem sie das Immunsystem aktivieren. Andererseits tragen sie auch zur Inhibition der auf die Dauer schädigenden Einflüsse des Immunsystems bei. Zudem haben sie einen großen Anteil in der Aufrechterhaltung der intestinalen epithelialen Barriere.

EGZ sezernieren das Zytokin IL-6, welches essentiell am entzündlichen Geschehen in verschiedenen entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt ist. Purinerge (P1- und P2-Rezeptoren) und cholinerge Rezeptoren (muskarinerg und nikotinerg, m/nAChR) sind bekannt dafür, auf EGZ exprimiert zu werden und im Allgemeinen an der Regulation von entzündlichen Prozessen im Gewebe beteiligt zu sein. Ferner stehen sie in engem Zusammenhang mit der Ausschüttung von IL-6. Während den P1-Rezeptoren sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen zugesprochen werden, werden die P2-Rezeptoren hauptsächlich als antiinflammatorisch beschrieben. Die AChR, vor allem die nAChR, haben bei inflammatorischen Prozessen im GI-Trakt eine überwiegend inhibitorische Funktion inne.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob EGZ zu einer IL-6-Freisetzung stimuliert werden können und ob diese Stimulation über die einzelnen purinergen und cholinergen Rezeptoren regulierbar ist.

Zunächst stellten wir die Hypothese eines negativen Feedback-Mechanismus auf, in dem ATP über die P2-Rezeptoren auf den EGZ die IL-6-Sekretion erhöht und sein Abbauprodukt Adenosin diesen Effekt über die P1-Rezeptoren wieder hemmt. Zusätzlich erwarteten wir eine Hemmung der IL-6-Sekretion durch Stimulation cholinergischer Rezeptoren.

Zu den Pilotuntersuchungen gehörte die Etablierung primärer EGZ-Kulturen und deren

Quantifizierung mittels Immunfluoreszenzmikroskopie. Als Marker diente hier der Gliamarker GFAP, der gleichzeitig in der Literatur als Marker der „aktivierten Gliazelle“ beschrieben wird. Des Weiteren wurde mittels IL-6-Antikörpern nachgewiesen, ob nach Stimulation der EGZ ein IL-6-Signal detektierbar ist. Zudem wurden Versuche mit spezifischen Agonisten und Antagonisten der verschiedenen purinergen und cholinergen Rezeptoren durchgeführt und die IL-6-Produktion mithilfe eines IL-6-ELISA gemessen.

Die Hypothese der antiinflammatorischen Wirkung von ACh konnte in Hinblick auf die ATP-vermittelte IL-6-Sekretion nicht bestätigt werden, weswegen weitere Versuche der Subtypen nicht erfolgten.

Daneben zeigte diese Arbeit eine erhöhte IL-6-Sekretion durch die kultivierten EGZ nach Stimulation mit ATP, wobei die Wirkung über den P2-Rezeptor vermittelt wurde. Der P2X₇-Rezeptor konnte als verantwortlicher Rezeptor ausgeschlossen werden. Die Identifizierung des genauen Subtyps gelang in dieser Arbeit nicht, jedoch konnte mittlerweile auf Basis der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten durch unsere Arbeitsgruppe der Rezeptorsubtyp P2X₂ als verantwortlich ermittelt werden. Als Konsequenz konnte daraus auch ein therapeutischer Ansatz mit dem P2X₂-Rezeptor-Antagonisten Ambroxol am Mausmodell vorgeschlagen werden.

Der vermutete negative Feedback-Mechanismus zeigte sich durch Hemmung der ATP-vermittelten IL-6-Sekretion über Stimulation des A_{2A}-Rezeptors. Uneindeutig war das Ergebnis nach Stimulation des A₃-Rezeptors, wonach geringere Konzentrationen des Agonisten die Wirkung von ATP auf die IL-6-Sekretion verstärkten und erst höhere Konzentrationen die Wirkung hemmen konnten, wobei die pharmakologischen Eigenschaften des getesteten A₃-Rezeptor-Agonisten einen *off-target*-Effekt vermuten lassen.

Weitere Forschungen sind notwendig, um die vielseitige und essentielle Rolle der aktivierte EGZ innerhalb intestinaler Entzündungsgeschehen zu ermitteln und so gezielte Therapien zu entwickeln.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: „Whole-mount“-Präparate	13
Abbildung 2: Purinerge und cholinerge Rezeptoren auf der EGZ	25
Abbildung 3: Expression von GFAP in den kultivierten, isolierten EGZ	37
Abbildung 4: Morphologisch unterschiedliche EGZ in der Zellkultur	38
Abbildung 5: Anteil einzelner Zelltypen in der EGZ-Kultur	39
Abbildung 6: Einfluss von IL-1 β auf die IL-6-Produktion von EGZ	40
Abbildung 7: Einfluss des unselektiven AChR-Agonisten Carbachol auf die IL-6-Produktion von EGZ	41
Abbildung 8: Einfluss von ATP und UTP γ S auf die IL-6-Produktion von EGZ	43
Abbildung 9: Einfluss von ATP mit UTP γ S auf die IL-6-Produktion von EGZ	44
Abbildung 10: Einfluss von ATP auf die IL-6-Produktion von EGZ in IL-6-Knock-Out-Mäusen	45
Abbildung 11: IL-6-Signal in den EGZ nach ATP-Stimulation	46
Abbildung 12: Einfluss des P2-Rezeptor-Antagonisten Suramin auf die IL-6-Produktion von EGZ	48
Abbildung 13: Einfluss von A740003 auf die IL-6-Produktion von EGZ	49
Abbildung 14: Einfluss von CGS21680 auf die IL-6-Produktion von EGZ	51
Abbildung 15: Einfluss von 2-CI-IBMeca auf die IL-6-Produktion von EGZ	52

7. Literaturverzeichnis

Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006. 7: 41–53

Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors. *Pharm Ther.* 1994. 64: 445–475

Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 2009. 32: 19–29

Ahmed AU. An overview of inflammation. *Front Biol.* 2011. 6: 274

Allaire JM, Crowley SM, Law HT, Chang S-Y, Ko H-J, Vallance BA. The Intestinal Epithelium. *Trends Immunol.* 2018. 39: 677–696

Alyoussef A. Suramin Attenuated Inflammation and Reversed Skin Tissue Damage in Experimentally Induced Atopic Dermatitis in Mice. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2014. 13: 406–410

Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. Immunity, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013. 13: 842–857

Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. The Purinergic System as a Pharmacological Target for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Pharmacol Rev.* 2019. 71: 345–382

Antonioli L, El-Tayeb A, Pellegrini C, Fornai M, Awwad O, Giustarini G, Natale G, Ryskalin L, Németh ZH, Müller CE, Blandizzi C, Colucci R. Anti-inflammatory effect of a novel locally acting A2A receptor agonist in a rat model of oxazolone-induced colitis. *Purinergic Signal.* 2018. 14: 27–36

Antonioli L, Lucarini E, Lambertucci C, Fornai M, Pellegrini C, Benvenuti L, Di Cesare

Mannelli L, Spinaci A, Marucci G, Blandizzi C, Ghelardini C, Volpini R, Dal Ben D. The Anti-Inflammatory and Pain-Relieving Effects of AR170, an Adenosine A3 Receptor Agonist, in a Rat Model of Colitis. *Cells*. 2020. 9: 1509

Antonioli L, Pacher P, Haskó G. Adenosine and inflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 2022. 43: 43–55

Aubé AC, Cabarrocas J, Bauer J, Philippe D, Aubert P, Doulay F, Liblau R, Galmiche JP, Neunlist M. Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut*. 2006. 55: 630-637

Baghdadi MB, Ayyaz A, Coquenlorge S, Chu B, Kumar S, Streutker C, Wrana JL, Kim T-H. Enteric glial cell heterogeneity regulates intestinal stem cell niches. *Cell stem cell*. 2022. 29: 86-100.e6

Baumgarten HG. Morphological Basis of Gastrointestinal Motility. In: Bertaccini G, Hrsg. *Mediators and Drugs in Gastrointestinal Motility I*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1982: 7–53

Boesmans W, Lasrado R, Berghe PV, Pachnis V. Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia*. 2015. 63: 229–241

Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000. 405: 458–462

Bours MJL, Swennen ELR, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5' - triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharm & Ther*. 2006. 112: 358 - 404

Boyen GBT von, Schulte N, Pfluger C, Spaniol U, Hartmann C, Steinkamp M. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC gastroenterol*. 2011. 11: 3

Boyen, G B T von, Steinkamp M, Reinshagen M, Schäfer K-H, Adler G, Kirsch J. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut*. 2004. 53: 222–228

Braun N, Sévigny J, Robson SC, Hammer K, Hanani M, Zimmermann H. Association of the ecto - ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system. *Glia*. 2004. 45: 124 - 132

Brown IAM, McClain JL, Watson RE, Patel BA, Gulbransen BD. Enteric Glia Mediate Neuron Death in Colitis Through Purinergic Pathways That Require Connexin-43 and Nitric Oxide. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2016. 2: 77–91

Burnstock G. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol*. 2006. 147: 172-181

Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol*. 1970. 40: 668–688

Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol*. 1985. 16: 433–440

Burnstock G, Knight GE. The potential of P2X7 receptors as a therapeutic target, including inflammation and tumour progression. *Purinergic Signal*. 2018. 14: 1–18

Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. Fulminant Jejuno-Ileitis following Ablation of Enteric Glia in Adult Transgenic Mice. *Cell*. 1998. 93: 189–201

Cabarrocas J, Savidge TC, Liblau RS. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia*. 2003. 41: 81–93

Calkins BM, Mendeloff AI. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Epidemiol Rev.* 1986. 8: 60–91

Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. The gut-brain axis. *Ann Gastroenterol.* 2015. 28: 203–209

Chaplin DD. Overview of the Immune Response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010. 125: 3-23

Cheadle GA, Costantini TW, Bansal V, Eliceiri BP, Coimbra R. Cholinergic signaling in the gut: a novel mechanism of barrier protection through activation of enteric glia cells. *Surg Infect.* 2014a. 15: 387–393

Cheadle GA, Costantini TW, Bansal V, Eliceiri BP, Coimbra R. Cholinergic signaling in the gut: a novel mechanism of barrier protection through activation of enteric glia cells. *Surg Infect.* 2014b. 15: 387–393

Chernyavsky AI, Arredondo J, Skok M, Grando SA. Auto/Paracrine control of inflammatory Cytokines by acetylcholine in macrophage-like U937 cells through nicotinic receptors. *Int Immunopharmacol.* 2010. 10: 308–315

Chow AK, Gulbransen BD. Potential roles of enteric glia in bridging neuroimmune communication in the gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2017. 312: G145-G152

Coelho-Aguiar JdM, Bon-Frauches AC, Gomes ALT, Verissimo CP, Aguiar DP, Matias D, Thomasi BBdM, Gomes AS, Brito GAdC, Moura-Neto V. The enteric glia. *Glia.* 2015. 63: 921–935

Collis MG, Hourani SM. Adenosine receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci.* 1993. 14: 360–366

Colquhoun LM, Patrick JW. Pharmacology of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Adv Pharmacol.* 1997. 39: 191–220

Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, Deng WL, Colombel JF, Lassmann H, Desreumaux P, Liblau RS. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. 98: 13306–13311

Costa DVS, Shin JH, Goldbeck SM, Bolick DT, Mesquita FS, Loureiro AV, Rodrigues-Jesus MJ, Brito GAC, Warren CA. Adenosine receptors differentially mediate enteric glial cell death induced by *Clostridioides difficile* Toxins A and B. *Front Immunol*. 2022. 13: 956326

Costantini TW, Krzyzaniak M, Cheadle GA, Putnam JG, Hageny A-M, Lopez N, Eliceiri BP, Bansal V, Coimbra R. Targeting alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor in the enteric nervous system. *Am J Pathol*. 2012. 181: 478–486

D'Antongiovanni V, Benvenuti L, Fornai M, Pellegrini C, van den Wijngaard R, Cerantola S, Giron MC, Caputi V, Colucci R, Haskó G, Németh ZH, Blandizzi C, Antonioli L. Glial A2B Adenosine Receptors Modulate Abnormal Tachykininergic Responses and Prevent Enteric Inflammation Associated with High Fat Diet-Induced Obesity. *Cells*. 2020a. 9(5):1245

D'Antongiovanni V, Fornai M, Pellegrini C, Benvenuti L, Blandizzi C, Antonioli L. The Adenosine System at the Crossroads of Intestinal Inflammation and Neoplasia. *Int J Mol Sci*. 2020b. 21(14): 5089

D'Antongiovanni V, Pellegrini C, Antonioli L, Benvenuti L, Di Salvo C, Flori L, Piccarducci R, Daniele S, Martelli A, Calderone V, Martini C, Fornai M. Palmitoylethanolamide Counteracts Enteric Inflammation and Bowel Motor Dysfunctions in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Pharmacol*. 2021. 12: 748021

Delvalle NM, Fried DE, Rivera-Lopez G, Gaudette L, Gulbransen BD. Cholinergic activation of enteric glia is a physiological mechanism that contributes to the regulation of gastrointestinal motility. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2018. 315: G473-G483

Di Virgilio F. Liaisons dangereuses. *Trends Pharmacol Sci.* 2007. 28: 465–472

Di Virgilio F, Boeynaems J-M, Robson SC. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr Opin Pharmacol.* 2009. 9: 507–513

Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity.* 2017. 47: 15–31

Di Virgilio F, Sarti AC, Coutinho-Silva R. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020. 318: C832-C835

Dogiel AS. Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und des Säugetiere. *Zeit. Naturforsch. B.* 1899. 5: 130–158

Drokhlyansky E, Smillie CS, van Wittenberghe N, Ericsson M, Griffin GK, Eraslan G, Dionne D, Cuoco MS, Goder-Reiser MN, Sharova T, Kuksenko O, Aguirre AJ, Boland GM, Graham D, Rozenblatt-Rosen O, Xavier RJ, Regev A. The Human and Mouse Enteric Nervous System at Single-Cell Resolution. *Cell.* 2020. 182: 1606-1622.e23

Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.* 1929. 68: 213–237

Escartin C, Guillemaud O, Carrillo - de Sauvage M - A. Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia.* 2019. 67: 2221 - 2247

Esposito G, Capoccia E, Turco F, Palumbo I, Lu J, Steardo A, Cuomo R, Sarnelli G, Steardo L. Palmitoylethanolamide improves colon inflammation through an enteric glia/toll like receptor 4-dependent PPAR-alpha activation. *Gut.* 2014. 63: 1300–1312

Eustace GJ, Melmed GY. Therapy for Crohn's Disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2018. 20:

Farro G, Stakenborg M, Gomez-Pinilla PJ, Labeeuw E, Goverse G, Di Giovangiulio M, Stakenborg N, Meroni E, D'Errico F, Elkrim Y, Laoui D, Lisowski ZM, Sauter KA, Hume DA, Van Ginderachter JA, Boeckxstaens GE, Matteoli G. CCR2-dependent monocyte-derived macrophages resolve inflammation and restore gut motility in postoperative ileus. *Gut*. 2017. 66: 2098–2109

Ferri G-L, Probert L, Cocchia D, Michetti F, Marangos PJ, Polak JM. Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature*. 1982. 297: 409–410

Fitz JG. Regulation of cellular ATP release. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2007. 118: 199–208

Francistiová L, Bianchi C, Di Lauro C, Sebastián-Serrano Á, Diego-García L de, Kobolák J, Dinnyés A, Díaz-Hernández M. The Role of P2X7 Receptor in Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci*. 2020. 13: 94

Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ*. 2007. 14: 1315–1323

Friedman DJ, Künzli BM, A-Rahim YI, Sevigny J, Berberat PO, Enjyoji K, Csizmadia E, Friess H, Robson SC. CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. 106: 16788–16793

Fujita A, Yamaguchi H, Yamasaki R, Cui Y, Matsuoka Y, Yamada K-I, Kira J-I. Connexin 30 deficiency attenuates A2 astrocyte responses and induces severe neurodegeneration in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride Parkinson's disease animal model. *J Neuroinflammation*. 2018. 15: 227

Fung C, Boesmans W, Cirillo C, Foong JPP, Bornstein JC, Vanden Berghe P. VPAC

Receptor Subtypes Tune Purinergic Neuron-to-Glia Communication in the Murine Submucosal Plexus. *Front Cell Neurosci.* 2017. 11: 118

Furness JB. *Enteric nervous system.* Oxford: Blackwell Publishing, 2006. 2: 4064

Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst.* 2000. 81: 87–96

Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012. 9: 286–294

Furness JB, Costa M. Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience.* 1980. 5: 1–20

Gabella G. Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J Anat.* 1972. 111: 69–97

Gabella G. Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine. *Neuroscience.* 1981. 6: 425–436

Galligan JJ, LePard KJ, Schneider DA, Zhou X. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst.* 2000. 81: 97–103

Burnstock G, Jacobson KA, Christofi FL. Purinergic Drug Targets for Gastrointestinal Disorders. *Curr Opin Pharmacol.* 2017. 37: 131

Gershon MD. The enteric nervous system. *Hosp Pract (1995).* 1999. 34: 31-32, 35-38, 41-42

Gershon MD. Functional Anatomy of the Enteric Nervous System. In: Holschneider AM, Puri P, Hrsg. *Hirschsprung's Disease and Allied Disorders.* Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2008: 21–49

Gershon MD, Rothman TP. Enteric glia. *Glia*. 1991. 4: 195–204

Goverse G, Stakenborg M, Matteoli G. The intestinal cholinergic anti-inflammatory pathway. *J Physiol*. 2016. 594: 5771–5780

Goyal RK, Hirano I. The Enteric Nervous System. *NEJM AI*. 1996. 334: 1106–1115

Grubišić V, Gulbransen BD. Enteric glia. *J Physiol*. 2017. 595: 557–570

Grubišić V, McClain JL, Fried DE, Grants I, Rajasekhar P, Csizmadia E, Ajjola OA, Watson RE, Poole DP, Robson SC, Christofi FL, Gulbransen BD. Enteric Glia Modulate Macrophage Phenotype and Visceral Sensitivity following Inflammation. *Cell Rep*. 2020. 32: 108100

Grundmann D, Loris E, Maas-Omlor S, Huang W, Scheller A, Kirchhoff F, Schäfer K-H. Enteric Glia. *Anat Rec (Hoboken)*. 2019. 302: 1333–1344

Gulbransen BD, Bashashati M, Hirota SA, Gui X, Roberts JA, MacDonald JA, Muruve DA, McKay DM, Beck PL, Mawe GM, Thompson RJ, Sharkey KA. Activation of neuronal P2X7 receptor–pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. *Nat Med*. 2012. 18: 600–604

Gulbransen BD, Sharkey KA. Purinergic Neuron-to-Glia Signaling in the Enteric Nervous System. *Gastroenterology*. 2009. 136: 1349–1358

Gulbransen BD, Sharkey KA. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nature reviews. Gastroenterol Hepatol*. 2012. 9: 625–632

Guzman J, Yu JG, Suntres Z, Bozarov A, Cooke H, Javed N, Auer H, Palatini J, Hassanain HH, Cardounel AJ, Javed A, Grants I, Wunderlich JE, Christofi FL. ADOA3R as a therapeutic target in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2006. 12: 766-89

Hanani M, Reichenbach A. Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 1994. 278: 153–160

Hansen MB. The Enteric Nervous System II. *Pharmacol Toxicol.* 2003a. 92: 249–257

Hasko G, Nemeth ZH, Vizi ES, Salzman AL, Szabo C. An agonist of adenosine A3 receptors decreases interleukin-12 and interferon-gamma production and prevents lethality in endotoxemic mice. *Eur J Pharmacol.* 1998. 358: 261–268

Haskó G, Cronstein B. Regulation of Inflammation by Adenosine. *Front Immunol.* 2013. 4: 85

Haskó G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzschild MA, Deitch EA, Mabley JG, Marton A, Szabó C. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-alpha production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J.* 2000. 14: 2065–2074

Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2008. 7: 759–770

Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell.* 1990. 63: 1149–1157

Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int Immunol.* 2021. 33: 127–148

Hoff S, Zeller F, von Weyhern CW, Wegner M, Schemann M, Michel K, Rühl A. Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti - Sox8/9/10 antibody. *J Comp Neurol.* 2008. 509: 356–371

Hohenegger M, Matyash M, Poussu K, Herrmann-Frank A, Sarközi S, Lehmann-Horn F, Freissmuth M. Activation of the skeletal muscle ryanodine receptor by suramin and suramin analogs. *Mol Pharmacol.* 1996. 50: 1443–1453

Hollenbach E, Ruhl A, Zoller M, Stremmel W. T cell activation by enteric glia — A novel pathway for the amplification of inflammatory responses in the enteric nervous system (ENS). *Gastroenterology*. 2000. 118: A184-A185

Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*. 2015. 16: 343–353

Jacobson KA, Merighi S, Varani K, Borea PA, Baraldi S, Aghazadeh Tabrizi M, Romagnoli R, Baraldi PG, Ciancetta A, Tosh DK, Gao Z-G, Gessi S. A3 Adenosine Receptors as Modulators of Inflammation. *Med Res Rev*. 2018. 38: 1031–1072

Jessen KR, Mirsky R. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature*. 1980. 286: 736–737

Jessen KR, Mirsky R. Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system. *J. Neurosci*. 1983. 3: 2206–2218

Jessen KR, Thorpe R, Mirsky R. Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein. *J Neurocytol*. 1984. 13: 187–200

Jonge WJ de, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, Berthoud H-R, Uematsu S, Akira S, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol*. 2005. 6: 844–851

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004. 2: 123–140

Kenneth A. Jacobson, Stefania Merighi, Katia Varani, Pier Andrea Borea, Stefania Baraldi, Mojgan Aghazadeh Tabrizi, Romeo Romagnoli, Pier Giovanni Baraldi, Antonella Ciancetta, Dilip K. Tosh, Zhan-Guo Gao, Stefania Gessi. A3 Adenosine Receptors as Modulators of

Inflammation. *Medic Res Rev.* 2018. 38: 1031–1072

Kim J, Lo L, Dormand E, Anderson DJ. SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron.* 2003. 38: 17–31

Kimball BC, Mulholland MW. Enteric Glia Exhibit P2U Receptors that Increase Cytosolic Calcium by a Phospholipase C - Dependent Mechanism. *J Neurochem.* 1996. 66: 604 – 612

Kirchgessner AL, Liu MT. Immunohistochemical localization of nicotinic acetylcholine receptors in the guinea pig bowel and pancreas. *J Comp Neurol.* 1998. 390: 497–514

La Sala A, Ferrari D, Corinti S, Cavani A, Di Virgilio F, Girolomoni G. Extracellular ATP Induces a Distorted Maturation of Dendritic Cells and Inhibits Their Capacity to Initiate Th1 Responses. *J Immunol.* 2001. 166: 1611–1617

Langness S, Kojima M, Coimbra R, Eliceiri BP, Costantini TW. Enteric glia cells are critical to limiting the intestinal inflammatory response after injury. *Am J Physiol Gast Liver Physiol.* 2017. 312: G274-G282

Li H, Li H, Qu H, Zhao M, Yuan B, Cao M, Cui J. Suramin inhibits cell proliferation in ovarian and cervical cancer by downregulating heparanase expression. *Cancer Cell Int.* 2015. 15: 52

Liñán-Rico A, Turco F, Ochoa-Cortes F, Harzman A, Needleman BJ, Arsenescu R, Abdel-Rasoul M, Fadda P, Grants I, Whitaker E, Cuomo R, Christofi FL. Molecular Signaling and Dysfunction of the Human Reactive Enteric Glial Cell Phenotype. *Inflamm Bowel Dis.* 2016. 22: 1812–1834

Liu ZM, Lu CC, Shen PC, Chou SH, Shih CL, Chen JC, Tien YC. Suramin attenuates intervertebral disc degeneration by inhibiting NF- κ B signalling pathway. *Bone Joint Res.* 2021. 10: 498–513

Liu C, Yang J. Enteric Glial Cells in Immunological Disorders of the Gut. *Front Cell Neurosci.* 2022. 16: 895871

Luo H, Wood K, Shi F-D, Gao F, Chang Y. Suramin is a novel competitive antagonist selective to $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABAA over p1 GABAC receptors. *Neuropharmacology.* 2018. 141: 148–157

Matteoli G, Gomez-Pinilla PJ, Nemethova A, Di Giovangiulio M, Cailotto C, van Bree SH, Michel K, Tracey KJ, Schemann M, Boesmans W, Vanden Berghe P, Boeckxstaens GE. A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen. *Gut.* 2014. 63: 938–948

McClain JL, Grubišić V, Fried D, Gomez-Suarez RA, Leininger GM, Sévigny J, Parpura V, Gulbransen BD. Ca^{2+} Responses in Enteric Glia Are Mediated by Connexin-43 Hemichannels and Modulate Colonic Transit in Mice. *Gastroenterology.* 2014. 146: 497-507.e1

McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin THJ, Radford-Smith G. Intestinal Barrier Dysfunction in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2009. 15: 100–113

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008. 454: 428–435

Mirsky R, Jessen KR. The neurobiology of Schwann cells. *Brain Pathol.* 1999. 9: 293–311

Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol.* 2014. 14: 667–685

Mudter J, Neurath MF. IL - 6 signaling in inflammatory bowel disease: Pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis.* 2007. 13: 1016 – 1023

Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine.

Arthritis Res. 2002. 4: 233-42

Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, van Landeghem L, Coron E, Wedel T, Naveilhan P, Ruhl A, Lardeux B, Savidge T, Paris F, Galmiche JP. Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am J Physiol Gast Liver Physiol.* 2007. 292: 231-241

Neunlist M, Rolli-Derkinderen M, Latorre R, van Landeghem L, Coron E, Derkinderen P, Giorgio R de. Enteric glial cells. *Gastroenterology.* 2014. 147: 1230–1237

Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem.* 2016. 60: 275–301

North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 2002. 82: 1013–1067

North RA, Slack BE, Surprenant A. Muscarinic M1 and M2 receptors mediate depolarization and presynaptic inhibition in guinea-pig enteric nervous system. *J Physiol.* 1985. 368: 435–452

North RA, Tokimasa T. Muscarinic synaptic potentials in guinea-pig myenteric plexus neurones. *J Physiol.* 1982. 333: 151–156

Ochoa-Cortes F, Turco F, Linan-Rico A, Soghomonyan S, Whitaker E, Wehner S, Cuomo R, Christofi FL. Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2016. 22: 433–449

Pasquini S, Contri C, Borea PA, Vincenzi F, Varani K. Adenosine and Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2021. 22: 7685

Pavlov VA, Tracey KJ. Controlling inflammation. *Biochem Soc Trans.* 2006. 34: 1037–1040

Pawłowska-Kamieniak A, Krawiec P, Pac-Kożuchowska E. Interleukin 6. *Adv Clin Exp*

Med. 2021. 30: 465–469

Progzatzky F, Shapiro M, Chng SH, Garcia-Cassani B, Classon CH, Sevgi S, Laddach A, Bon-Frauches AC, Lasrado R, Rahim M, Amaniti E-M, Boeing S, Shah K, Entwistle LJ, Suárez-Bonnet A, Wilson MS, Stockinger B, Pachnis V. Regulation of intestinal immunity and tissue repair by enteric glia. *Nature*. 2021. 599: 125–130

Rakers C, Schleif M, Blank N, Matušková H, Ulas T, Händler K, Torres SV, Schumacher T, Tai K, Schultze JL, Jackson WS, Petzold GC. Stroke target identification guided by astrocyte transcriptome analysis. *Glia*. 2019. 67: 619–633

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 1998. 50: 413–492

Rao JN, Wang J-Y. Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2010

Rao M, Nelms BD, Dong L, Salinas-Rios V, Rutlin M, Gershon MD, Corfas G. Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. *Glia*. 2015. 63: 2040–2057

Ren T, Grants I, Alhaj M, McKiernan M, Jacobson M, Hassanain HH, Frankel W, Wunderlich J, Christofi FL. Impact of Disrupting Adenosine A3 Receptors (A3^{-/-}AR) on Colonic Motility or Progression of Colitis in the Mouse. *Inflamm Bowel Dis*. 2011. 17: 1698-1713

Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*. 2006. 2: 409–430

Rosas-Ballina M, Tracey KJ. Cholinergic control of inflammation. *J Intern Med*. 2009. 265: 663–679

Rosenbaum C, Schick MA, Wollborn J, Heider A, Scholz C-J, Cecil A, Niesler B, Hirrlinger J, Walles H, Metzger M. Activation of Myenteric Glia during Acute Inflammation In Vitro and In Vivo. *PloS one*. 2016. 11: e0151335

Rueda Ruzafa L, Cedillo JL, Hone AJ. Nicotinic Acetylcholine Receptor Involvement in Inflammatory Bowel Disease and Interactions with Gut Microbiota. *Int J Environ Res Public Health*. 2021. 18: 1189

Rühl A. Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil*. 2005. 17: 777–790

Rühl A, Franzke S, Collins SM, Stremmel W. Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gast Liver Physiol*. 2001. 280: G1163-G1171

Rühl A, Nasser Y, Sharkey KA. Enteric glia. *Neurogastroenterol Motil*. 2004. 16 Suppl 1: 44–49

Saiag B, Bodin P, Shacoori V, Catheline M, Rault B, Burnstock G. Uptake and Flow-induced Release of Uridine Nucleotides from Isolated Vascular Endothelial Cells. *Endothelium*. 2009. 2: 279–285

Saldana-Morales FB, Kim DV, Tsai M-T, Diehl GE. Healthy Intestinal Function Relies on Coordinated Enteric Nervous System, Immune System, and Epithelium Responses. *Gut Microbes*. 2021. 13: 1916376

Salzer JL. Schwann Cell Myelination. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015. 7:020529

Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, Hurst R, Sofroniew MV. Enteric Glia Regulate Intestinal Barrier Function and Inflammation Via Release of S-Nitrosoglutathione. *Gastroenterology*. 2007. 132: 1344–1358

Schneider R, Leven P, Glowka T, Kuzmanov I, Lysson M, Schneiker B, Miesen A, Baqi Y,

Spanier C, Grants I, Mazzotta E, Villalobos-Hernandez E, Kalff JC, Müller CE, Christofi FL, Wehner S. A novel P2X2 - dependent purinergic mechanism of enteric gliosis in intestinal inflammation. *EMBO Mol Med.* 2021. 13: 12724

Schneider R, Leven P, Mallesh S, Breßer M, Schneider L, Mazzotta E, Fadda P, Glowka T, Vilz TO, Lingohr P, Kalff JC, Christofi FL, Wehner S. IL-1-dependent enteric gliosis guides intestinal inflammation and dysmotility and modulates macrophage function. *Commun Biol.* 2022. 5: 811

Seguella L, Gulbransen BD. Enteric glial biology, intercellular signalling and roles in gastrointestinal disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021. 18: 571–587

Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation. *Nat Immunol.* 2005. 6: 1191

Shao B-Z, Wang S-L, Fang J, Li Z-S, Bai Y, Wu K. Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Alleviates Inflammatory Bowel Disease Through Induction of AMPK-mTOR-p70S6K-Mediated Autophagy. *Inflammation.* 2019. 42: 1666–1679

Sharkey KA. Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. *J Clin Investig.* 2015. 125: 918–925

Silva-Vilches C, Ring S, Mahnke K. ATP and Its Metabolite Adenosine as Regulators of Dendritic Cell Activity. *Front Immunol.* 2018. 9: 2581

Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Tubaro C, Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S100B protein in tissue development, repair and regeneration. *World J Biol Chem.* 2013. 4: 1–12

Spear ET, Mawe GM. Enteric neuroplasticity and dysmotility in inflammatory disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2019. 317: G853-G861

Stakenborg M, Abdurahiman S, De Simone V, Goverse G, Stakenborg N, van Baarle L, Wu Q, Pirottin D, Kim J-S, Chappell-Maor L, Pintelon I, Thys S, Pollenus E, Boon L, van

den Steen P, Hao M, van Ginderachter JA, Boeckxstaens GE, Timmermans J-P, Jung S, Marichal T, Ibiza S, Matteoli G. Enteric glial cells favor accumulation of anti-inflammatory macrophages during the resolution of muscularis inflammation. *Mucosal Immunol.* 2022. 15:1296-1308

Stoffels B, Hupa KJ, Snoek SA, van Bree S, Stein K, Schwandt T, Vilz TO, Lysson M, Veer CV't, Kummer MP, Hornung V, Kalff JC, De Jonge WJ, Wehner S. Postoperative ileus involves interleukin-1 receptor signaling in enteric glia. *Gastroenterology.* 2014. 146: 176-87.e1

Straub RH, Wiest R, Strauch UG, Härle P, Schölmerich J. The role of the sympathetic nervous system in intestinal inflammation. *Gut.* 2006. 55: 1640–1649

Suzuki Y, Saito H, Kasanuki J, Kishimoto T, Tamura Y, Yoshida S. Significant increase of interleukin 6 production in blood mononuclear leukocytes obtained from patients with active inflammatory bowel disease. *Life Sci.* 1990. 47: 2193–2197

Szabo C, Scott GS, Virag L, Egnaczyk G, Salzman AL, Shanley TP, Hasko G. Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists. *J Pharmacol.* 1998. 125: 379–387

Taylor P, Brown JH, Synthesis, Storage and Release of Acetylcholine. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Hrsg. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999: 258-282.

Trautmann A. Extracellular ATP in the Immune System. *Sci. Signal.* 2009. 2: pe6-pe6

Turco F, Sarnelli G, Cirillo C, Palumbo I, Giorgi F de, D'Alessandro A, Cammarota M, Giuliano M, Cuomo R. Enteroglia-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells. *Gut.* 2014. 63: 105–115

Umehara Y, Kudo M, Nakaoka R, Kawasaki T, Shiomi M. Serum proinflammatory

cytokines and adhesion molecules in ulcerative colitis. *Hep Gastroenterol.* 2006. 53: 879–882

van Landeghem L, Chevalier J, Mahé MM, Wedel T, Urvil P, Derkinderen P, Savidge T, Neunlist M. Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011. 300: G976–87

van Landeghem L, Mahé MM, Teusan R, Léger J, Guisle I, Houlgatte R, Neunlist M. Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells. *BMC Genomics.* 2009. 10: 1–20

Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017. 11: 821–834

Verkhatsky A, Burnstock G. Biology of purinergic signalling. *Bio Essays.* 2014. 36: 697–705

Wareham KJ, Seward EP. P2X7 receptors induce degranulation in human mast cells. *Purinergic Signal.* June, 2016. 12: 235–246

Wehner S, Schwarz NT, Hundsdorfer R, Hierholzer C, Tweardy DJ, Billiar TR, Bauer AJ, Kalff JC. Induction of IL-6 within the rodent intestinal muscularis after intestinal surgical stress. *Surgery.* 2005. 137: 436–446

Wynn G, Rong W, Xiang Z, Burnstock G. Purinergic mechanisms contribute to mechanosensory transduction in the rat colorectum. *Gastroenterology.* 2003. 125: 1398–1409

Yoo BB, Mazmanian SK. The Enteric Network. *Immunity.* 2017. 46: 910–926

Yu Y-B, Li Y-Q. Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. *World J*

Gastroenterol. 2014. 20: 11273–11280

Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci.* 2012. 32: 6391–6410

Zarek PE, Huang C-T, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, Drake CG, Powell JD. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood.* 2008. 111: 251–259

Zhang J-M, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007. 45: 27–37

Zhang W, Segura BJ, Lin TR, Hu Y, Mulholland MW. Intercellular calcium waves in cultured enteric glia from neonatal guinea pig. *Glia.* 2003. 42: 252–262

Zhao M, Gönczi L, Lakatos PL, Burisch J. The Burden of Inflammatory Bowel Disease in Europe in 2020. *J Crohns Colitis.* 2021. 15: 1573–1587

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Sven Wehner, für seine hervorragende Betreuung, die interessante Themenstellung, seinen Rat und seine enorme Unterstützung bei der Anleitung zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten sowie der Umsetzung dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei der AG Wehner, dem chirurgischen Forschungslabor für Immunpathophysiologie der Universitätsklinik Bonn, insbesondere Bianka Schneiker, Dr. Kathy Stein, Mariola Lysson und Dr. Reiner Schneider, für ihre vielseitige, professionelle praktische und theoretische Unterstützung bedanken, die mir durch ihre freundliche und geduldige Art die Laborarbeit zu einer angenehmen und lehrreichen Zeit gemacht haben.

Für die großzügige finanzielle Unterstützung sowie die wissenschaftliche Fortbildung möchte ich zudem dem BonnNi-Stipendium meinen Dank ausdrücken.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich durch die Jahre immer unterstützt, begleitet und motiviert haben.