

Der Einfluss einer Glia-spezifischen Depletion des MyD88 und des Interleukin-1 Rezeptor 1 auf die chemisch induzierte Kolitis im Mausmodell

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Stefanie Lück-Fuhrmann, geb. Lück

aus Köln

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sven Wehner
2. Gutachter: Prof. Dr. Jacob Nattermann

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.08.2024

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

Für meine Familie

In Erinnerung an Eva-Maria Papp

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung	10
1.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	10
1.1.1	Morbus Crohn	10
1.1.2	Colitis ulcerosa	11
1.2	Pathophysiologie und Risikofaktoren	12
1.3	Therapieoptionen	14
1.4	Enterische Gliazellen	15
1.4.1	Enterische Gliazellen im Allgemeinen	15
1.4.2	Enterische Gliazellen in Entzündung	17
1.5	Das Adapterprotein MyD88 und assoziierte Signalwege	19
1.6	Der Interleukin-1 Signalweg	22
1.7	Fragestellung	24
2.	Material und Methoden	26
2.1	Tiere	26
2.2	<i>Dextran-Sulfat-Natrium</i> (DSS) Modell	27
2.3	Organpräparation und Probenaufarbeitung	28
2.3.1	Separierung von Tunica mucosa und muscularis externa	30
2.4	Bestimmung der Kolonlänge	30
2.5	<i>Disease Activity Index</i>	30
2.6	<i>Mouse Colitis Histology Index</i>	31
2.7	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	33
2.8	Immunhistochemische Färbung der Whole-Mounts	33
2.9	Proteinisolation	34
2.10	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	35
2.11	Verwendete Chemikalien und Lösungen	35
2.12	Statistische Datenanalyse	36
3.	Ergebnisse	37
3.1	DSS-Kolitis in Wildtyp-Mäusen	37

3.2	Die Untersuchung des Effektes von 3 % DSS in GFAP-Cre ^{-/-} x MyD88 ^{fl/fl} und GFAP-Cre ^{+/+} x MyD88 ^{fl/fl} Mäusen	45
3.3	Die Untersuchung des Effektes von 3 % DSS in GFAP-Cre ^{-/-} x IL-1R1 ^{fl/fl} und GFAP-Cre ^{+/+} x IL-1R1 ^{fl/fl} Mäusen	51
4.	Diskussion	57
4.1	Die Etablierung des DSS-Modells in Wildtyp-Mäusen	57
4.2	Die Rolle der EGZ im Krankheitsverlauf bei DSS-Kolitis	59
4.3	Limitationen der Arbeit	62
5.	Zusammenfassung	64
6.	Abbildungsverzeichnis	66
7.	Tabellenverzeichnis	68
8.	Literaturverzeichnis	69
9.	Danksagung	86

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALDH1L1	Aldehyd-Dehydrogenase 1 L1
ANOVA	Varianzanalyse (<i>ANalysis Of VAriance</i>)
AP-1	Aktivator-Protein 1
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
C57BL/6	C57 black 6
CAPS	Cryopyrin-assoziiertes periodisches Syndrom
CCL-2	CC-Chemokin-Ligand 2
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
DAI	Krankheitsindex (<i>Disease Activity Index</i>)
DAMPs	<i>Danger-associated molecular patterns</i>
DD	N-terminale <i>Death Domäne</i>
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
DSS	<i>Dextran-Sulfat-Sodium</i>
EGZ	Enterische Gliazellen
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ENS	Enterisches Nervensystem
FMF	Familiäre Mittelmeerfieber
g	Erdbeschleunigung
GDNF	<i>Glial-Derived Neurotrophic Factor</i>
GFAP	Saures Gliafaserprotein
GFAP-Cre ⁻	Mäuse ohne Cre, Cre-negative Mäuse
GFAP-Cre ⁺	Mäuse mit Cre, Cre-positive Mäuse
GLAST	Glutamat Transporter Slc1a3
HET	Haus für experimentelle Therapie
ICE	<i>IL-1β converting enzyme</i>
IFN- γ	Interferon-gamma
IHC	Immunhistochemie

IKK	Inhibitorische kappa-Kinasen
IL	Interleukin
IL-1	Interleukin-1
IL-13	Interleukin-13
IL-17	Interleukin-17
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptoren
IL-1R1	Interleukin-1 Rezeptor Typ 1
IL-1R3	Interleukin-1 Co-Rezeptor Typ 3, IL-1RAcP
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
IL-1 α	Interleukin-1-alpha
IL-1 β	Interleukin-1-beta
IL-6	Interleukin-6
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinasen
IRF	Interferon-regulatorische Faktoren
JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen
KBS	Krebs-Ringer-Lösung, Bikarbonat-gepuffert
Ki-67	Proliferationsmarker-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MC	Tunica mucosa
MCHI	<i>Mouse Colitis Histology Index</i>
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
ME	Tunica muscularis externa
MHC I	Haupthistokompatibilitätskomplex Typ I
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex Typ II
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response protein 88</i>
n	Anzahl
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NF κ B	nukleärer Faktor kappa B
NKZ	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
P	Punkte
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PLP1	Proteolipid-Protein 1
POI	Postoperativer Ileus
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i> (Mustererkennungsrezeptoren)
RAGE	<i>Receptor for Advance Glycation Endproducts</i>
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
S100-b	Calcium/Zink-bindendes Protein S100-beta
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
Tab.	Tabelle
Th1	T-Helferzellen Typ 1
Th17	T-Helferzellen Typ 17
Th2	T-Helferzellen Typ 2
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TLR3	Toll-like Rezeptor Typ 3
TLR4	Toll-like Rezeptor Typ 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Toll	C-terminale Toll Domäne
TRAF	TNF-Rezeptor-assozierte Faktoren
T-Test	Hypothesentest der t-Verteilung
vs.	versus
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

In Deutschland sind schätzungsweise 420.000 Menschen an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED) erkrankt (Gröne 2019). Es wird von einer Prävalenz des Morbus Crohn von 100-200/100.000 Einwohner und Colitis ulcerosa von 160-250/100.000 Einwohner ausgegangen (Schnorbach und Kruis 2021). Jeder fünfte Betroffenen ist ein Kind oder ein Jugendlicher (Baumgart 2009). Europaweit werden die Krankheitsfälle auf circa 1/310 für Morbus Crohn und 1/198 für Colitis ulcerosa geschätzt (Wehkamp et al. 2016). Männer und Frauen erkranken gleichermaßen (Torres et al. 2017; Ungaro et al. 2017). Laut Studien sind Inzidenz und Prävalenz in den letzten 10 Jahren vor allem in den westlichen Ländern gestiegen (Baumgart 2009). Da das Erstmanifestationsalter für beide Formen der CED in jungen Jahren liegt, entstehen durch die lebenslange Therapie neben direkten Kosten für die medizinische Behandlung ebenso indirekte krankheits-assoziierte Kosten durch eventuelle Arbeitsunfähigkeit, Erwerbsminderung, Berentung oder Ähnliches (Stark et al. 2006). Die indirekten Kosten werden dabei auf über 50 % der Gesamtkosten geschätzt (Schnorbach und Kruis 2021; Stark et al. 2006). So stellen diese Erkrankungen zusätzlich zum Leidensdruck der Betroffenen einen großen Kostenfaktor für das Gesundheitssystem dar.

1.1.1 Morbus Crohn

Der Morbus Crohn, auch Enterokolitis regionalis genannt, tritt primär zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf (Molodecky et al. 2012). Er kann den kompletten Magen-Darm-Trakt von Mundhöhle bis Anus befallen und zeigt diskontinuierliche, segmental auftretende Entzündungsherde (Veauthier und Hornecker, JR 2018). Wobei terminales Ileum und rechtsseitiges Kolon am häufigsten betroffen sind (Magro et al. 2013). Je nach Befallsmuster leiden die Patienten unter chronisch-rezidivierenden Abdominalschmerzen und Diarrhö, begleitet von Abgeschlagenheit, Fieber und ungewolltem Gewichtsverlust bis hin zu Anorexie (Torres et al. 2017). Bei Befall des Kolon kommt es nicht selten zu perianalen Blutungen oder blutiger Diarrhö (Torres et al. 2017). Bei bis zu 50 % der Betroffenen kommt es zu extraintestinalen Manifestationen in Haut (Erythema nodosum),

Gelenken (Arthritis) und Augen (Uveitis) sowie Begleiterkrankungen wie der primär sklerosierenden Cholangitis (Veauthier und Hornecker, JR 2018). Neben der Endoskopie als Goldstandard zur Diagnosestellung, spielen die Histopathologie, radiologische Bildgebung sowie laborchemische Parameter aus Blut und Stuhl eine wesentliche Rolle (Torres et al. 2017). Insbesondere das fäkale Calprotectin scheint mit der Schwere der Entzündung zu korrelieren (Menees et al. 2015). Makroskopisch imponiert ein diskontinuierliches, Pflasterstein-Relief-artiges Entzündungsgeschehen mit Ulzera, Erythem, Erosionen und verminderter Gefäßzeichnung. Daneben sind mikroskopisch transmurale Entzündungsinfiltrate, Metaplasien und epitheloide Granulome typische Kennzeichen (Magro et al. 2013; Ortwein et al. 2017). Bei 50 % der Erkrankten kommt es innerhalb von 20 Jahren nach Diagnosestellung zu Komplikationen wie Fisteln, Abzessen oder Stenosen (Thia et al. 2010). Wie Forschungsarbeiten zeigen, weisen Betroffene im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ein höheres Risiko auf, an intestinalen und extraintestinalen Malignomen zu erkranken. Als Ursache hierfür werden neben dem Entzündungsgeschehen im Magen-Darm-Trakt auch die allgemeinen Lebensumstände und Medikamente wie Immunsuppressiva vermutet (Beaugerie und Itzkowitz 2015).

1.1.2 Colitis ulcerosa

Das Erstmanifestationsalter der Colitis ulcerosa liegt zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr (Ungaro et al. 2017). Klinisch imponiert die Erkrankung durch chronisch-rezidivierende Beschwerden in Form von Diarrhö, abdominellen Schmerzen, Gewichtsverlust, Fatigue, Appetitverlust, perianalem Blutabgang bis hin zur Anämie (Yeshi et al. 2020). Desweiteren weisen die Betroffenen ein höheres Risiko auf, im Laufe ihres Lebens an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, wobei das Risiko mit der Größe der Inflammation, dem männlichen Geschlecht und der Erkrankungsdauer steigt (Yeshi et al. 2020). Die Diagnosestellung erfolgt anhand der Endoskopie, der Histopathologie, der radiologischen Befunde sowie der Untersuchung von Blut und Stuhl (Dignass et al. 2012). Typische Befallsmuster sind die Proktitis, die Linksseitenkolitis und die Pankolitis, wohingegen die Backwash-Ileitis weniger häufig auftritt (Magro et al. 2013). Makroskopisch zeigt sich ein kontinuierlicher Befall, der zumeist auf das Kolon beschränkt ist und von aboral nach oral hin fortschreitet (Magro et al. 2013). Die endoskopischen

Befunde umfassen Erosionen, Ulzera, Erytheme, Granulationen, Pseudopolypen, Blutungen, Stenosen und eine verminderte Gefäßzeichnung (Annese et al. 2013).

Mikroskopisch zeigt sich ein trans muköses Geschehen in Form von großflächig veränderter Kryptenarchitektur (Atrophie), Entzündungsinfiltraten mit basaler Plasmozytose, Becherzellverlust und gegebenenfalls Kryptenabzessen (Magro et al. 2013; Yeshi et al. 2020).

1.2 Pathophysiologie und Risikofaktoren

Die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist bis heute weitgehend ungeklärt. Es wird angenommen, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt, bei welchem sowohl Umweltfaktoren, intestinale Mikroflora, das Immunsystem als auch genetische Faktoren Einfluss nehmen (Danese und Fiocchi 2006; Goetz und Hoffman 2012; Zhang und Li 2014). Hierbei wird pathogenetisch von einer komplexen Barrierestörung der Darmschleimhaut mit nachfolgendem Eindringen von Antigenen und einer überproportionalen immunologischen Reaktion ausgegangen (Salim und Söderholm 2011). Die Barrierestörung scheint sich aus einem Zusammenspiel von gestörter Schleimschicht, Insuffizienz epithelialer *Tight Junctions* sowie einer Dysbiose der intestinalen Mikroflora zu ergeben (Eckburg et al. 2005; Yeshi et al. 2020). So zeigte sich in entzündlich veränderten Darmabschnitten bei Patienten mit CED eine andere Zusammensetzung des Mikrobioms verglichen mit gesunder Darmflora (Joossens et al. 2011).

Auf immunologischer Ebene werden neben dem angeborenen (unspezifischen) Immunsystem verschiedenen T-Helferzellen des erworbenen (spezifischen) Immunsystems in der Pathogenese von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa eine zentrale Rolle zugeschrieben (Yeshi et al. 2020). In Bezug auf das angeborene Immunsystem, findet man bei beiden Formen der CED gleichermaßen eine vermehrte Anzahl an Makrophagen, neutrophilen Killerzellen und dendritischen Zellen mit deutlich erhöhter Aktivität (Sartor 2006). Daraus resultiert eine gesteigerte Produktion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine, Rezeptoren, Co-Stimulatoren und Adhäsionsmolekülen, gefolgt von der Aktivierung sowie der Rekrutierung immunologischer Zellen des erworbenen Immunsystems (B- und T-Lymphozyten) (Eckburg et al. 2005; Sartor 2006).

Betrachtet man das erworbene Immunsystem, scheint die Entstehung der Colitis ulcerosa insbesondere durch eine gesteigerte Aktivität von T-Helferzellen Typ 2 (Th2) beeinflusst zu werden (Yeshi et al. 2020). Diese produzieren gemeinsam mit natürlichen Killerzellen (NKZ) vermehrt das Zytokin Interleukin-13 (IL-13), welches wie auch der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), die Epithelbarriere durch eine gesteigerte epitheliale Apoptose, eine Veränderung der *Tight Junctions* und eine Abnahme der epithelialen Regeneration beeinflusst (Fuss et al. 1996; Heller et al. 2005; Heller et al. 2008). Durch die so erhöhte Permeabilität kommt es vermehrt zum Eindringen von Antigenen, woraufhin die Antigenpräsentation durch entsprechende Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen über Toll-like Rezeptoren (TLR) erfolgt (Ungaro et al. 2017). Dies initiiert eine Entzündungskaskade mit Rekrutierung von Lymphozyten, Differenzierung von T-Zellen in verschiedene Subtypen sowie gesteigerter Produktion und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise Interleukin-1, -4, -5, -6, -9, -10, -13 und TNF- α (Yeshi et al. 2020).

In der Genese des Morbus Crohn werden den T-Helferzellen Typ 1 und 17 (Th1, Th17) besondere Schlüsselfunktionen zugeschrieben (Yeshi et al. 2020). Durch eine gesteigerte Aktivierung von Th1 und Th17 durch antigenpräsentierende Zellen, kommt es zu erhöhten Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-17 (IL-17). Hierbei ist anzumerken, dass Th1 ebenfalls durch IL-17 stimuliert werden (Kolls und Lindén 2004). So kommt es ähnlich wie bei Colitis ulcerosa zu einem komplexen Entzündungsgeschehen, welches die Rekrutierung und Differenzierung weiterer Immunzellen umfasst und zu einer erhöhten Produktion von Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Chemokinen und Zytokinen wie IFN- γ , IL-17, -23, -6 und TNF- α führt (Petagna et al. 2020).

Neben der Immunologie wird auch von einer genetischen Komponente ausgegangen, wie die Tatsache, dass 12 % der Erkrankten eine familiäre Vorbelastung aufzeigen, nahelegt (Moller et al. 2015). Man geht von mehr als 160 Risikogenen aus, wobei diese auf die Entstehung von Morbus Crohn einen größeren Einfluss haben als auf Colitis ulcerosa (Wehkamp et al. 2016). Dabei sind vor allem Genmutationen des für die Antigenerkennung bedeutsamen NOD2-Gens mit einem höheren Risiko für Morbus Crohn assoziiert (Ogura et al. 2001). Faktoren wie Antibiotikaeinnahme, Drogenkonsum, Diät, gastrointestinale Infekte, Appendektomie, Schlafmangel, Stress und weitere

psychologische Aspekte begünstigen die Entstehung einer CED (Yeschi et al. 2020; Zhang und Li 2014). Des Weiteren erhöhen die Einnahme von Antibiotika speziell im erstem Lebensjahr (Shaw et al. 2010) sowie der regelmäßige Konsum von Aspirin oder nicht-steroidalen Antirheumatika das Erkrankungsrisiko (Ananthakrishnan et al. 2012). Während Patienten mit Morbus Crohn zur Nikotinkarenz angehalten werden, scheint das Rauchen bei Colitis ulcerosa einen protektiven Effekt zu haben (Matsuoka et al. 2018). Die Ursache hierfür ist unbekannt. Als allgemein protektive Faktoren gelten eine regelmäßige körperliche Aktivität und gesunde Ernährung. Studien zufolge scheint eine optimale Vitamin D Versorgung ebenfalls präventiv zu sein (Leslie et al. 2008).

1.3 Therapieoptionen

Die Therapieziele in der Behandlung der CED sind die klinische Remission ohne Steroidbehandlung sowie die Vermeidung von Komplikationen (Peyrin-Biroulet et al. 2012; Stark et al. 2006; Torres et al. 2017). Dabei richtet sich die Therapie primär nach Erkrankungsschwere, Befallsmuster, Ansprechen auf vorangegangene Therapien, Begleiterkrankungen, potentiellen Nebenwirkungen und dem Patientenwillen (Ordás et al. 2012). Unabhängig von den Therapiemaßnahmen, wird den Betroffenen eine regelmäßige Kontrolluntersuchung per Endoskopie empfohlen, um eine frühzeitige Diagnose und Behandlung möglicher Komplikationen zu gewährleisten (Lübbbers et al. 2010). Zur Einteilung der CED im klinischen Alltag dient die Montreal-Klassifikation, welche Befall, Komplikationen und Alter bei Erstdiagnose zusammenfasst (Satsangi et al. 2006). Je nach Therapieansprechen und Schweregrad der Entzündung gibt es verschiedene Eskalationsstufen, wobei die chirurgische Intervention die höchste Stufe darstellt (Kucharzik et al. 2019).

Allgemein wird zwischen Schub- und Erhaltungstherapie unterschieden. Im akuten Schub haben sich Medikamente wie Glukokortikoide und Immunmodulatoren wie Azathioprin und Biologika, insbesondere der Anti-TNF- α -Antikörper, durchgesetzt. Während bei Colitis ulcerosa primär Aminosalicylate zum Einsatz kommen, haben diese bei Morbus Crohn einen geringeren Stellenwert (Cheifetz 2013; Manthey et al. 2021; Ordás et al. 2012). Zur Remissionserhaltung sollten Glukokortikoide aufgrund des ausgeprägten Nebenwirkungsprofils nicht verwendet werden (Lindgren et al. 2002).

In der aktuellen S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) werden hier unter Berücksichtigung des individuellen Krankheitsverlaufs und vorheriger Therapie Thiopurinanaloga (Azathioprin, 6-Mercaptopurin), Anti-TNF- α -Antikörper (Infliximab, Adalimumab, Golimumab), Anti-IL-12/23-Antikörper (Ustekinumab), Anti- α 4 β 7-Integrin-Antikörper (Vedolizumab), JAK-Inhibitoren und bei Colitis ulcerosa 5-Aminosalicylate empfohlen (Sturm et al. 2022; Kannengiesser und Kucharzik 2020; Kucharzik et al. 2019). Als Zweitlinientherapie kann außerdem die Anwendung des apathogenen Escherichia-coli-Stamms Nissle 1917 bei Colitis ulcerosa und Methotrexat bei Morbus Crohn in Betracht gezogen werden (Kannengiesser und Kucharzik 2020; Manthey et al. 2021; Sturm et al. 2022). Trotz der mittlerweile vielseitigen medikamentösen Optionen, muss bei 20-30 % der Colitis ulcerosa Patienten und bei circa 70 % der Betroffenen mit Morbus Crohn im Verlauf eine chirurgische Intervention erwogen werden (Ordás et al. 2012; Wehkamp et al. 2016).

1.4 Enterische Gliazellen

1.4.1 Enterische Gliazellen im Allgemeinen

Das enterische Nervensystem (ENS) umfasst circa 100 Millionen Zellen und besteht neben Neuronen auch aus enterischen Gliazellen (EGZ) (Rühl et al. 2004). Die Mehrheit der EGZ findet sich in Plexus myentericus (Auerbach-Plexus) und submucosus (Meissner-Plexus), wo sie die neuronalen Zellen umhüllen (Gulbransen und Sharkey 2012). Beim Menschen kommen EGZ je nach Lokalisation circa eineinhalb (Plexus submucosus) bis sechsmal (Plexus myentericus) häufiger vor als Neuronen (Hoff et al. 2008; Rühl et al. 2004). Sie bilden ein großes Netzwerk, welches sich von Tunica muscularis bis Lamina propria mucosae zieht und reichen mit ihren Ausläufern an epitheliale Basalmembran und submuköse Kapillaren heran (Boyen et al. 2011).

EGZ sind von anderen Gliazellen wie Mikroglia, Oligodendrozyten, Schwann Zellen und Astrozyten trotz mancher Gemeinsamkeiten auf Transkriptionsebene abzugrenzen. Sie exprimieren beispielsweise den Transkriptionsfaktor SOX10 und das für myelinisierende Gliazellen typische Proteolipid-Protein 1 (PLP1), andere für die Myelinisierung benötigte Proteine jedoch nicht (Rao et al. 2015).

In vieler Hinsicht ähneln sie besonders den Astrozyten des zentralen Nervensystems (ZNS). So stehen EGZ ebenso wie Astrozyten untereinander über *Gap Junctions* in Kontakt und produzieren Proteine wie das saure Gliafaserprotein (GFAP), das Calcium/Zink-bindende Protein S100-beta (S100-b), Vimentin sowie die Glutaminsynthetase (Boesmans et al. 2015; Ferri et al. 1982; Holland et al. 2021; Jessen und Mirsky 1985; Özbek et al. 2018; Rao et al. 2015).

Die in Astrozyten exprimierte Aldehyd-Dehydrogenase 1 L1 (ALDH1L1) oder der Glutamat Transporter Slc1a3 (GLAST) kommen in EGZ jedoch nicht vor (Rao et al. 2015).

EGZ übernehmen eine zentrale Rolle in der Funktionalität des Gastrointestinaltraktes (Rühl et al. 2004). Sie stehen nicht nur als neurosupportive Zellen in engem Kontakt mit enterischen Neuronen und koordinieren darüber Motilität und Sekretion, sondern sind ebenfalls in immunologische Prozesse involviert. Mittlerweile ist erwiesen, dass EGZ mit einer Vielzahl von Zelltypen einschließlich Neuronen, Epithelzellen, enteroendokrinen und immunologischen Zellen kommunizieren (Gulbransen und Sharkey 2012; Holland et al. 2021; Rosenbaum et al. 2016; Rosenberg und Rao 2021).

Zudem sind EGZ an Plexus Architektur, Integrität der Epithelbarriere sowie der Regulation der Kapillarpermeabilität beteiligt (Meir et al. 2021). So zeigten Versuche im Tiermodell, dass ein Mangel an EGZ zu einer gestörten ENS-Architektur, mangelhafter Epithelintegrität und erhöhter endothelialer Permeabilität mit submuköser Vaskulitis und Entzündungen des Darmes führt (Cornet et al. 2001). Zudem postulieren Steinkamp et al. eine antiapoptotische Wirkung auf epitheliale Zellen des durch Gliazellen gebildeten *Glia-Derived Neurotrophic Factors* (GDNF) (Steinkamp et al. 2003). Des Weiteren ergaben Zellkulturversuche von Meir et al., dass sowohl das Fehlen von GDNF als auch die Blockade des GDNF-Rezeptors zu einer Zunahme der Permeabilität der intestinalen Epithelbarriere führen (Meir et al. 2021).

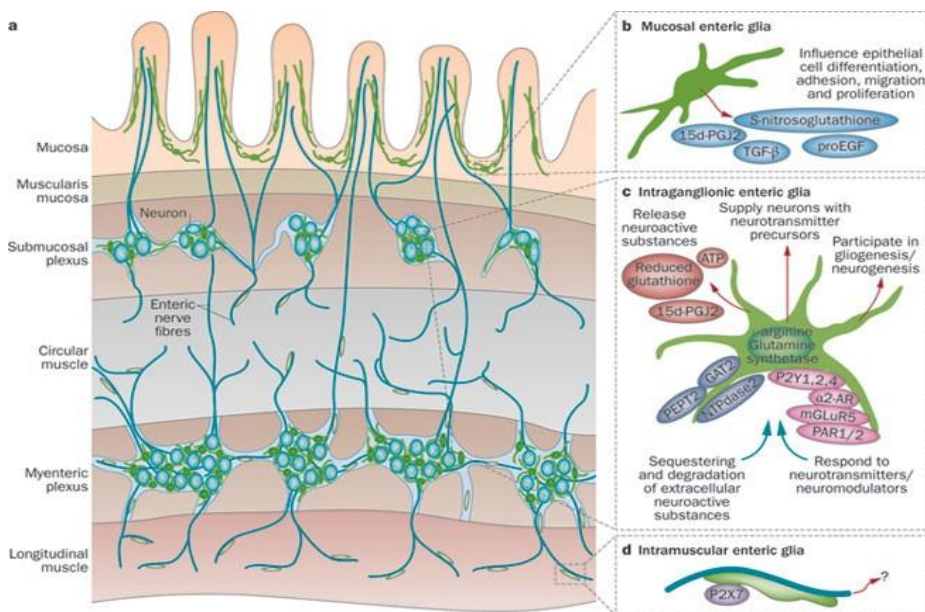


Abb. 1: Lokalisation der enterischen Gliazellen in der Darmwand. Wie hier zu sehen, umgeben EGZ vor allem enterische Neuronen und sitzen in großer Anzahl insbesondere im Plexus myentericus und submucosus. Daneben finden sich EGZ auch intramuskulär und kommen zahlreich in der Mucosa vor (Gulbransen und Sharkey 2012).

1.4.2 Enterische Gliazellen in Entzündung

EGZ werden immunmodulatorische Funktionen zugeschrieben, welche neben der Synthese und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine auch die Rekrutierung und Stimulation von Immunzellen umfassen. So demonstrierten Schneider et al. in Zellkulturversuchen eine gesteigerte Proliferation und Synthese von Chemokinen und Zytokinen durch EGZ nach Stimulation mit Interleukin-1 β (IL-1 β) (Schneider et al. 2022). Daneben beeinflussen EGZ die Zelldifferenzierung und Migration immunologischer Zellen wie Makrophagen (Schneider et al. 2021; Schneider et al. 2022; Stakenborg et al. 2022). Untersuchungen von Boyen et al. bei CED-Patienten zeigten eine stark erhöhte Expression von GFAP und GDNF bei Colitis ulcerosa als Zeichen gesteigerter Aktivität der EGZ. Bei Morbus Crohn wurden im Gegensatz dazu nur gering erhöhte Konzentrationen von GFAP und GDNF gemessen (Boyen et al. 2011). EGZ besitzen eine Antigen-präsentierende Funktion und exprimieren die Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC)-I und -II (Chow et al. 2021; Cornet et al. 2001; Koretz et al. 1987). Geboes et al. konnten bei Patienten mit Morbus Crohn eine gesteigerte Expression von MHC-II nachweisen (Geboes et al. 1992).

Neben seiner Rolle als klassischer Aktivitätsmarker der EGZ wird S100-b auch eine immunmodulatorische Funktion zugeschrieben. So gehört S100-b zu den sogenannten *Danger-associated molecular patterns* (DAMPs) und kann über den *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) eine Immunreaktion auszulösen (Ochoa-Cortes et al. 2016). Cirillo et al. beobachteten an EGZ unter Exposition mit Lipopolysacchariden (LPS) und IFN- γ *in vitro* eine vermehrte Zellproliferation, Expression von S100-b und GFAP sowie Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) als Folge der über S100-b-RAGE aktivierten NO-Synthetase der EGZ (Cirillo et al. 2011; Ochoa-Cortes et al. 2016).

Des Weiteren haben Turco et al. die Expression verschiedener Rezeptoren wie diverser TLR des angeborenen Immunsystems in EGZ beschrieben (Turco et al. 2014). Hierbei haben EGZ in Zellkulturversuchen auf Pathogene über die TLR mit einer erhöhten Expression von MHC-II, c-Fos und der Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie NO und S-Nitrosogluthation reagiert (Savidge et al. 2007; Turco et al. 2014).

Zudem zeigten *in vitro* Versuche mit zuvor isolierten humanen EGZ, dass diese zwischen pathogenen (enteroinvasiven *Escherichia coli*) und probiotischen (*Lactobacillus paracasei*) Bakterien differenzieren können. So führte die Exposition mit pathogenen Bakterien nicht aber die mit probiotischen zu einer veränderten TLR-Synthese, vermehrten S100-b Expression als Zeichen erhöhter Aktivität sowie der Freisetzung von NO. Bei Inhibition der TLR und S100-b Signalwege hingegen blieben diese Reaktionen aus (Turco et al. 2014).

In den vergangenen Jahren ist das Interesse am aktiven Einfluss von EGZ auf entzündliche Prozesse im Gastrointestinaltrakt gestiegen.

Hierbei haben Stoffels et al. durch ihre Untersuchungen zur Pathogenese des postoperativen Ileus (POI), einer Komplikation operativer Eingriffe basierend auf neuronaler Dysregulation und Inflammation (Wehner et al. 2007), den Interleukin-1 (IL-1) Signalweg in den Vordergrund gerückt. So entwickelten genetisch modifizierte Mäuse ohne den Interleukin-1 Rezeptor 1 (IL-1R1) oder das Adaptermolekül MyD88 nach chirurgischer, intestinaler Manipulation keinen POI (Stoffels et al. 2014). Im Gegensatz dazu konnte der POI bei Tieren, in denen TLR oder der Interleukin-18 (IL-18) Signalweg genetisch ablatiert wurden, nicht verhindert werden. Daneben ergaben *in vitro* Zellkulturversuche, dass EGZ auf Stimulation mit IL-1 β mit einer vermehrten Expression

des IL-1R1, der Aktivierung des Entzündungsmarkers c-Fos sowie der Synthese und Freisetzung von Interleukin-6 (IL-6) und dem CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL-2) reagieren (Miampamba und Sharkey 1999; Rühl et al. 2001; Stoffels et al. 2014), was eine direkte Einbindung in inflammatorische Prozesse nahelegt.

Schneider et al. untersuchten anschließend speziell den Einfluss der EGZ über den IL-1R1 in der Entstehung des POI und zeigten bei Mäusen ohne den IL-1R1 in EGZ eine geringere Anzahl an POI und weniger Gewebeeinfiltration proinflammatorischer Zellen (Schneider et al. 2022).

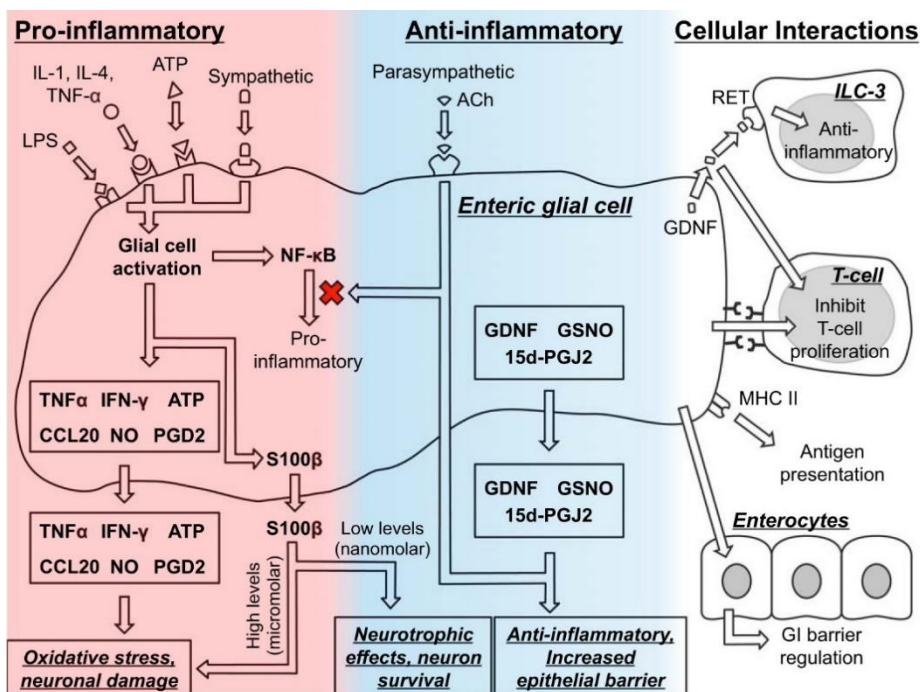


Abb. 2: Überblick über die Funktionen der enterischen Gliazellen. Beispielhaft dargestellt sind pro- und antiinflammatorische Funktionen sowie die Interaktion mit Zellen wie Enterozyten oder Immunzellen über diverse Mediatoren (Chow und Gulbransen 2017).

1.5 Das Adapterprotein MyD88 und assoziierte Signalwege

Bei dem sogenannten *Myeloid differentiation primary response protein 88* (MyD88) handelt es sich um ein Adapterprotein, welches mit diversen TLR und Interleukin-1 Rezeptoren (IL-1R) assoziiert ist (Adachi et al. 1998; Wang et al. 2014). Es spielt eine essentielle Rolle in der Signalweiterleitung nach Rezeptorstimulation und stellt somit einen wesentlichen Faktor des unspezifischen Immunsystems dar.

TLR gehören zu den *pattern recognition receptors* (PRRs) und sind in der Lage nach Stimulation durch sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und DAMPs eine frühe innate Immunantwort auszulösen (Janeway und Medzhitov 2002; Vijay 2018). Daneben werden IL-1R von diversen Interleukinen stimuliert.

Beide Rezeptortypen gehören der Toll/Interleukin-1 Rezeptor (TIR) Familie an und sind transmembrane Rezeptoren mit einem extrazellulären und einem zytoplasmatischen Teil. Letzterem ist unter anderem das Adaptermolekül MyD88 angelagert, welches sowohl eine C-terminale Toll Domäne (Toll) als auch eine N-terminale *Death Domäne* (DD) zur Interaktion mit Signalmolekülen besitzt (Burns et al. 1998; Deguine und Barton 2014). Wie TLR und IL-1R besitzt MyD88 die sogenannte Toll–IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne, über welche Rezeptor und Adapterprotein interagieren (Narayanan und Park 2015). *In vivo* liegt MyD88 über Zwischenbindungen von DD – DD und Toll – Toll als Homodimer vor (Burns et al. 1998).

Bei Rezeptorstimulation folgt der jeweilige MyD88-vermittelte Signalweg. Dabei wird über diverse Mediatoren wie IL-1R-assoziierte Kinasen (IRAK), inhibitorische kappa-Kinasen (IKK), c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) und TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren (TRAF) beispielsweise die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie dem nukleären Faktor kappa B (NFkB), dem Aktivator Protein 1 (AP-1) und Interferon-regulatorischen Faktoren (IRF) initiiert. Dies führt zur Synthese und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Interferonen Typ I (Akira und Takeda 2004; Narayanan und Park 2015; Wang et al. 2014).

Die über TLR induzierte Synthese und Freisetzung inflammatorischer Zytokine ist bei allen TLR bis auf den Toll-like Rezeptor Typ 3 (TLR3) MyD88-abhängig, wobei der Toll-like Rezeptor Typ 4 (TLR4) sowohl abhängig als auch unabhängig von MyD88 auf einen Stimulus reagiert (Takeda und Akira 2004). Burns et al. zeigten in *in vitro* Zellkulturversuchen eine durch Überexpression von MyD88 ausgelöste vermehrte Aktivierung von NFkB und JNK sowie einen gestörten IL-1 Signalweg bei funktionsunfähigem MyD88 (Burns et al. 1998). Wang et al. beschrieben bei Untersuchung des Einflusses von TLR auf die Pathogenese von Entzündungen und Tumoren sowohl protektive als auch proinflammatorische Einflüsse der Rezeptoren (Wang et al. 2014).

Des Weiteren postulierten Adachi et al., dass Mäuse mit genetisch-abladiertem MyD88 eine beeinträchtigte T-Zell Proliferation sowie Synthese von Akute-Phase-Proteinen und Zytokinen aufweisen. So kam es bei den Mäusen nach intravenöser Applikation von IL-1 β zu keinen gesteigerten Konzentrationen von TNF- α und IL-6 im Serum, während die Wildtyp-Mäuse mit signifikant erhöhten Werten imponierten (Adachi et al. 1998).

Im Vergleich dazu zeigten *in vivo* Versuche von Rakoff-Nahoum et al. mit Mäusen, in denen das MyD88 Protein ausgeschaltet wurde, einen schwereren Krankheitsverlauf und vermehrtes Versterben bei durch *Dextran-Sulfat-Natrium*-induzierter Kolitis (Rakoff-Nahoum et al. 2004).

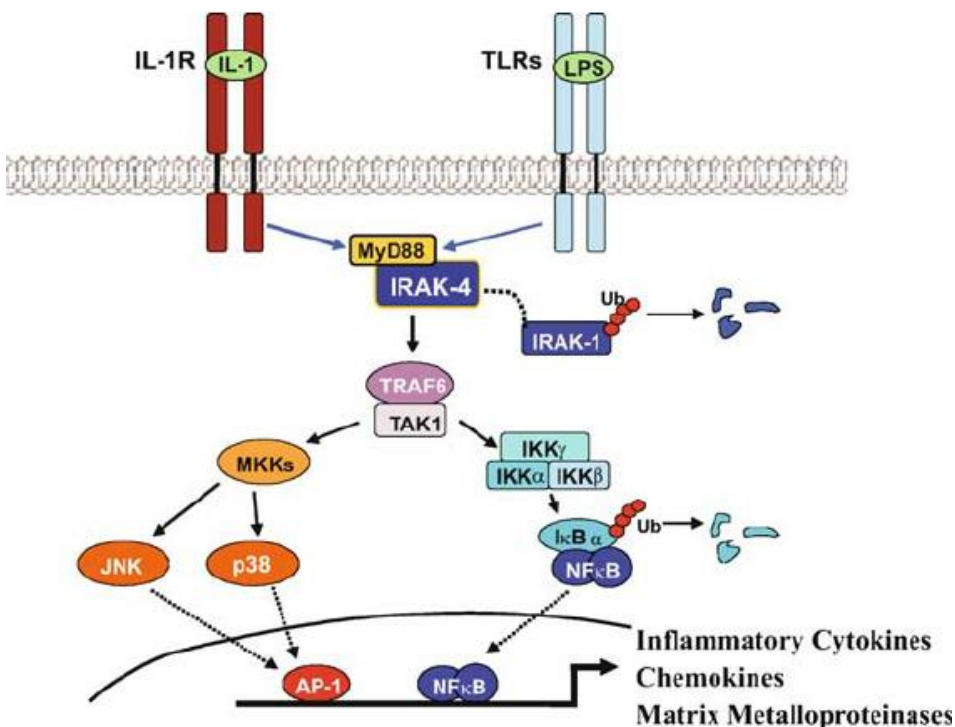


Abb. 3: Schematische Darstellung des MyD88-abhängigen Signalweges.

Hier dargestellt am Toll-like Rezeptor und dem Interleukin-1 Rezeptor Typ 1. *IκB*, inhibitory protein B; *IKK*, inhibitory protein B kinase; *IL-1*, interleukin-1; *IL-1R*, IL-1 receptor; *IRAK*, IL-1 receptor associated kinase; *JNK*, c-Jun N-terminal kinase; *LPS*, lipopolysaccharide; *MKK*, MAPK kinase; *MyD88*, myeloid differentiation factor 88; *NF-κB*, nuclear factor-κB; *TAK1*, transforming growth factor β activated kinase 1; *TLRs*, Toll-like receptors; *TRAF6*, tumor necrosis factor-associated factor 6; *Ub*, ubiquitin; (Koziczak-Holbro et al. 2008).

1.6 Der Interleukin-1 Signalweg

Der Interleukin-1 Rezeptor Typ 1 (IL-1R1) gehört zur Familie der IL-1R, welche an regulatorischen Prozessen der unspezifischen Immunantwort und Homöostase beteiligt sind. Er wird von nahezu allen Zellen exprimiert (Weber et al. 2010).

IL-1R1 bilden zusammen mit TLR die Superfamilie der Toll-Interleukin-1 Rezeptoren (TIR), dessen gemeinsames Merkmal die sogenannte TIR-Domäne des zytosolischen Rezeptorsegmentes ist. An diese angelagert befindet sich das Adapterprotein MyD88, welches für die Signalweiterleitung nach Rezeptorstimulation eine entscheidende Schlüsselfunktion innehat (Garlanda et al. 2013; Sims und Smith 2010).

Es gibt drei verschiedene Liganden des IL-1R1. Hierbei stellen Interleukin-1 α (IL-1 α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) die beiden Agonisten dar. Sie lösen nach Bindung an die extrazelluläre, Immunglobulin-haltige Domäne, eine Konformationsänderung des Rezeptors aus, welche zu der Rekrutierung des IL-1 Co-Rezeptors 3 (IL-1R3, IL-1RAcP) führt (Boraschi und Tagliabue 2013; Casadio et al. 2001; Greenfeder et al. 1995).

Der so entstandene IL-1 Rezeptor Komplex ist Grundlage für die nachgeschaltete Signalkaskade und führt über MyD88 zur Aktivierung diverser Kinasen sowie der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1. Diese initiieren die Synthese von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionmolekülen, NO und Prostaglandin-E2, welche die unspezifische Immunantwort fördern (Dinarello 2009; Weber et al. 2010). IL-1 α und IL-1 β werden hauptsächlich von Makrophagen und Monozyten freigesetzt, jedoch auch von Zellen wie Fibroblasten, Hepatozyten, Endothel- und Epithelzellen ausgeschüttet (Netea et al. 2009; Weber et al. 2010). Während IL-1 α primär lokal seine Wirkung entfaltet und mit der Zelloberfläche assoziiert ist, wirkt IL-1 β systemisch. Die Effektivität von IL-1 β ist von der katalytischen Aktivität des IL-1 β *converting enzyme* (ICE, Caspase-1) abhängig, welches Pro-IL-1 β in biologisch aktives IL-1 β umwandelt (Monteleone et al. 2015; Sims und Smith 2010).

Der dritte Ligand des IL-1R1 ist der IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1Ra), der ebenfalls von Immunzellen produziert wird. Bei dessen Stimulation bleibt die Rekrutierung von IL-1R3 aus, wodurch die Signaltransduktion gestört wird (Greenfeder et al. 1995).

Eine strenge Regulation, insbesondere die der IL-1 β -Sekretion und des IL-1 β /IL-1Ra-Gleichgewichts, ist von zentraler Bedeutung für das unspezifische Immunsystem.

Untersuchungen der letzten Jahre zeigen, dass eine dysregulierte, gesteigerte IL-1 Produktion häufig mit dem Auftreten autoimmuner und -inflammatorischer Erkrankungen korreliert (Cavalli und Dinarello 2015; Lachmann et al. 2009; Scheinecker 2015). Zu den klassischen Erkrankungen mit autoinflammatorischer Komponente zählen die rheumatoide Arthritis, das familiäre Mittelmeerfieber (FMF), der Morbus Still, die juvenile idiopathische Arthritis, die Gicht Arthritis und das Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrom (CAPS) (Cavalli und Dinarello 2015; Scheinecker 2015). Aksentijevich et al. beobachteten bei Patienten mit einer homozygoten Mutation oder Deletion des IL-1Ra-Genes ein vermehrtes Auftreten autoinflammatorischer Krankheitsbilder mit Beginn bereits im Kindesalter (Aksentijevich et al. 2009). Aufgrund der entscheidenden Rolle des IL-1 Signalweges kommen in der Behandlung neben den klassischen Immunsuppressiva vermehrt IL-1 β - und IL-1R1-Inhibitoren zum Einsatz (Burger et al. 2006; Lachmann et al. 2009). So führt die Therapie mit Canakinumab, einem IL-1 β -Inhibitor, bei Patienten mit CAPS zu einer klinischen Besserung und Konzentrationen von IL-1 β im Normbereich (Lachmann et al. 2009). Eine Studie von So et al. zur Wirksamkeit des IL-1R1-Blockers Anakinra, einem synthetisch hergestellten IL-1Ra, zeigte ein Therapieansprechen mit rascher Symptombesserung bei Patienten mit akuter Gichtarthritis (So et al. 2007). Untersuchungen der letzten Jahre stellen außerdem einen Zusammenhang zwischen einer überschießenden Aktivierung der Caspase-1 mit dadurch erhöhter IL-1 β Produktion und der Entstehung diverser autoinflammatorischer und -immuner Erkrankungen her (Winkler et al. 2016). Siegmund et al. induzierten bei Mäusen, deren ICE genetisch ablatiert wurde, mittels *Dextran-Sulfat-Natrium* eine Kolitis. Hierbei wiesen die Knockout-Mäuse deutlich mildere Krankheitsverläufe auf, was die bedeutsame Funktion der Caspase-1 in inflammatorischen Prozessen unterstreicht (Siegmund et al. 2001).

Erste Hinweise auf eine Beteiligung des IL-1R1 in EGZ entstammen einer Studie von Stoffels et al. Hier konnte gezeigt werden, dass EGZ den IL-1R1 exprimieren und nach Stimulation mit IL-6- und CCL-2-Sekretion reagieren. Zudem waren IL-1R1-defiziente und MyD88-defiziente Mäuse vor einer Darmentzündung nach chirurgischem Trauma und der Entwicklung eines POI geschützt (Stoffels et al. 2014). Mäuse, denen vor operativer Manipulation ein IL-1Ra oder ein Antikörper gegen IL-1 α oder IL-1 β gegeben wurde, entwickelten ebenfalls keinen POI. Mittlerweile wird IL-1 β zudem eine Schlüsselfunktion in der Interaktion von EGZ und Makrophagen zugeschrieben. So kam es bei *in vivo*

Versuchen von Schneider et al. bei Knockout-Mäusen ohne IL-1R1 in EGZ zu signifikant geringerer Makrophageninvasion, geringerer EGZ-Proliferation und signifikant weniger POI (Schneider et al. 2022).

Die Rolle der EGZ in Inflammation ist komplex und vielseitig. So besitzen sie die Fähigkeit zur Antigenpräsentation, Rekrutierung und Stimulation von Immunzellen sowie Sekretion proinflammatorischer Chemo- und Zytokine (Chow et al. 2021; Stakenborg et al. 2022). Außerdem exprimieren sie TLR und den IL-1R1, auf deren Stimulation sie beispielsweise mit Proliferation (Schneider et al. 2022), Expression von S100-b (Cirillo et al. 2011), Aktivierung von c-Fos und Freisetzung von IL-6, CCL-2 und NO reagieren (Stoffels et al. 2014; Turco et al. 2014). Dies legt einen aktiven Einfluss auf Entzündungsgeschehen im Darm nahe. Bisher wurde die Funktion der EGZ in akuter Entzündung des Dünndarms, wie beispielsweise dem POI, untersucht. Über deren Einfluss aus Entzündungen im Dickdarm, wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn, ist jedoch wenig bekannt.

1.7 Fragestellung

Ziel dieser Doktorarbeit ist die Untersuchung des Einflusses der EGZ auf den Verlauf von entzündlichen Prozessen im Dickdarm.

Grundlage ist die Beobachtung, dass MyD88- und IL-1R1-Aktivität in EGZ eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des POI spielen. So kommt es bei Mäusen ohne diese Signalwege in EGZ nach intestinaler Manipulation nicht zu einem POI und einer verminderten Entzündungsreaktion. Die Fähigkeit von EGZ nach IL-1 β Stimulation proinflammatorische Zytokine freizusetzen und die Gewebeeinfiltration durch immunologische Zellen wie Makrophagen zu fördern, scheint hier ein wesentlicher Faktor zu sein. Wir postulieren, dass EGZ auch an Entzündungen des Kolons beteiligt sind und vergleichbare Signalwege zugrunde liegen könnten.

Um die Bedeutung des IL-1R1-Signalweges in EGZ in einer Kolitis darzustellen, lösen wir diese in drei unterschiedlichen Tierlinien mithilfe von *Dextran-Sulfat-Natrium* (DSS) aus. Dabei wenden wir das DSS-Modell zunächst bei Wildtyp-Mäusen (Erster Teil dieser Arbeit) an, um die zu betrachtenden Parameter zur Untersuchung der EGZ festzulegen. Im Anschluss greifen wir auf genetisch veränderte Mäuse zurück, in denen der IL-1R1-

Signalweg in EGZ über eine Defizienz des Adapterproteins MyD88 (Zweiter Teil) oder des IL-1R1 (Dritter Teil) genetisch abklariert wurde.

Unsere Hypothese ist, dass, angelehnt an die vorherigen Studien zum POI, sowohl die Dysfunktionalität von TLRs wie auch des IL-1R1-Signalweges in EGZ zu einem milderem Krankheitsverlauf bei einer induzierten Kolitis führen.

2. Material und Methoden

2.1 Tiere

Die Untersuchungen wurden an 8-12 Wochen alten männlichen und weiblichen C57 black 6 (C57BL/6) Mäusen mit einem Ausgangsgewicht von 20-25 g durchgeführt.

Die Tierhaltung erfolgte in einer speziellen keimarmen, vollklimatisierten Umgebung mit einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus im Haus für experimentelle Therapie (HET) des Universitätsklinikums Bonn. In einem Käfig befanden sich gemäß den allgemeinen Richtlinien maximal fünf Mäuse. Die Einstreu wurde in einem sechs-tägigen Rhythmus und bei Bedarf gewechselt. Zur Fütterung wurden handelsübliches Nagetierfutter (ssniff, Soest, Deutschland) und autoklaviertes Leitungswasser gegebenenfalls unter Zugabe von 3 % DSS verwendet. Bei Durchführung wurden stets die Richtlinien des Tierschutzgesetzes beachtet. Der Tierversuchsantrag wurde von der verantwortlichen Bezirksregierung Köln (LANUV) genehmigt und läuft unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2016.A367.

Die verwendeten Mäuse wurden mithilfe des Cre/loxP-Systems genetisch verändert. Hierbei handelt es sich um ein sequenzspezifisches Rekombinationssystem, mit welchem einzelne Zellarten im lebenden Organismus gezielt genetisch modifiziert werden, indem mit Hilfe eines Enzyms eine zuvor markierte DNA-Sequenz entfernt wird (Hoess et al. 1982; Sternberg und Hamilton 1981; Rajewsky et al. 1996). Das Ziel-Gen wird dabei mit sogenannten loxP-Stellen markiert und die Cre-Rekombinase, ein Enzym, das die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA katalysiert, erkennt und bindet die loxP-Stellen und schneidet einzelne Exons heraus, wodurch es zu einem Verlust der Genfunktion kommt. Um nur in bestimmten Zellen das gewünschte Gen zu deaktivieren, wird die DNA-Sequenz der Cre-Rekombinase zuvor mit der Promotorsequenz eines Zell-spezifischen Gens zu einem Transgen zusammengefasst und in das Genom eingebracht (Hoess et al. 1982; Rajewsky et al. 1996). Auf diese Weise kommt es nur in den gewünschten Zellen zur Expression der Cre-Rekombinase und somit zum Ausschalten des Ziel-Gens.

Während im ersten Teil dieser Arbeit C57BL/6 Wildtypen beobachtet wurden, wurden im zweiten Teil Mäuse mit dem Genotyp GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} verglichen. Dafür wurden zuvor CBy.129P2(B6)-Myd88tm1Defr/J (Jackson Laboratory, USA, Lagernummer 009108) und B6.Cg-Tg73.12Mvs/J (Jackson Laboratory, USA,

Lagernummer 012886) Mäuse verpaart (Garcia et al. 2004; Hou et al. 2008). Die so entstandenen Mäuse besitzen alle ein mit loxP markiertes MyD88-Gen und zum Teil eine an den Promotor des GFAP-Gens gekoppelte Cre-Rekombinase, sodass in Mäusen mit dem Genotyp GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} das Adapterprotein MyD88 in GFAP-positiven Zellen wie beispielsweise den EGZ nicht transkribiert wird.

Für den dritten Teil der Untersuchungen wurden B6.129(Cg)-Il1r1tm1.1Rbl/J (Jackson Laboratory, USA, Lagernummer 028398) und B6.Cg-Tg73.12Mvs/J Mäuse (Jackson Laboratory, USA, Lagernummer 012886) verpaart und die Nachkommen mit den Genotypen GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} und GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} miteinander verglichen (Hou et al. 2008; Robson et al. 2016). Die so entstandenen Cre-positiven Nachkommen besitzen keinen IL-1R1 in den GFAP-positiven Zellen. Da Mäuse ohne das Cre-Gen (GFAP-Cre^{-/-}) funktionell dem genetischen Wildtypen entsprechen, wurden die Tiere GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} in den folgenden Analysen zusammengefasst betrachtet.

2.2 Dextran-Sulfat-Natrium (DSS) Modell

Das sogenannte *Dextran-Sulfat-Natrium* (DSS) Modell ist eine etablierte Methode, um mit Hilfe von DSS eine Kolitis im Tiermodell auszulösen. Bei DSS (*Dextran Sulfate Sodium Salt, Colitis Grade*, MP Biomedicas 216011090, Deutschland) handelt es sich um ein negativ geladenes, wasserlösliches Polysaccharid, welches bei einer Menge von 40-50 kDa im Trinkwasser eine der Colitis ulcerosa beim Menschen stark ähnelnde Entzündungsreaktion bewirkt (Chassaing et al. 2014; Okayasu et al. 1990).

Klinisch imponiert die Kolitis primär mit Gewichtsverlust, blutigem Stuhl und Diarrhö (Kim et al. 2012). Durch Änderung von DSS-Konzentration und Applikationsdauer können sowohl akute als auch chronische Entzündungen verursacht werden.

Wir wandten eine modifizierte Version des DSS-Modells an. Hierbei verabreichten wir der Behandlungsgruppe autoklaviertes Leitungswasser mit 3 % DSS für eine Dauer von fünf Tagen, während die Kontrollgruppe in dieser Zeit reines autoklaviertes Trinkwasser ad libitum bekam. Im Anschluss beobachteten wir die Mäuse für weitere zwei oder sieben Tage. In diesem Zeitraum bekamen alle Tiere autoklaviertes Leitungswasser.

Demnach opferten wir die eine Gruppe am siebten Versuchstag (5+2), um einen Einblick in das akute Entzündungsgeschehen zu erhalten und die andere am zwölften

Versuchstag (5+7), um eine mögliche Rückbildung der Inflammation zu untersuchen. Während der gesamten Versuchsperiode wurden alle Mäuse täglich gewogen und deren Aktivität, Stuhlverhalten sowie jegliche Besonderheiten dokumentiert. Bei einem Gewichtsverlust von mehr als 25-30 % oder sehr schlechtem Allgemeinzustand wurde eine vorzeitige Tötung durchgeführt.

Diese erfolgte bei allen Versuchstieren mittels zervikaler Dislokation unter Isofluran-Narkose.

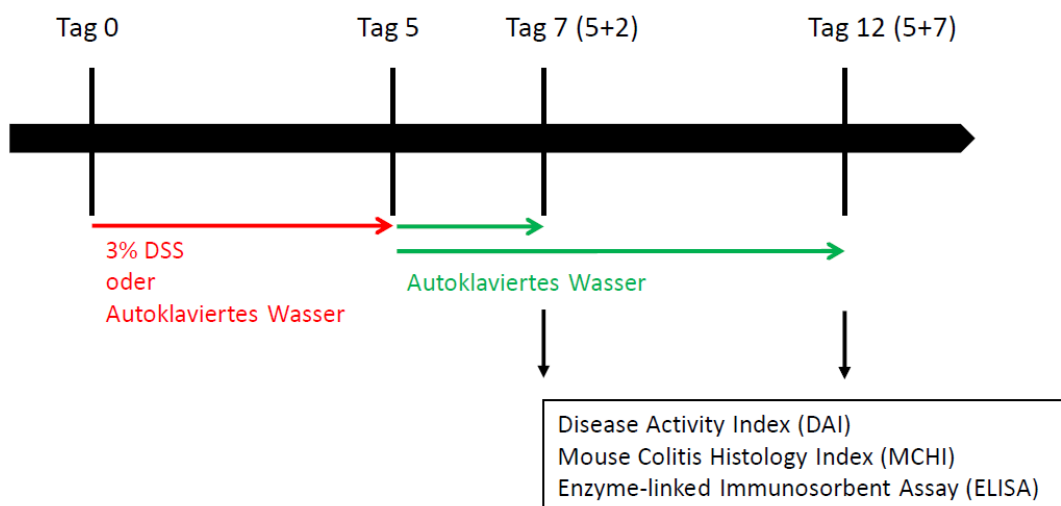


Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Die Versuchstiere bekamen je nach Gruppe für fünf Tage reines oder mit 3 % DSS versetztes, autoklaviertes Leitungswasser ad libitum. Anschließend wurden die Tiere für weitere zwei oder sieben Tage beobachtet. In diesem Zeitraum erhielten alle Tiere autoklaviertes Leitungswasser. Nach Beendigung des Zeitraumes wurden der *Disease Activity Index* (DAI) und der *Mouse Colitis Histology Index* (MCHI) analysiert und jeweils für IL-6 und TNF- α ein *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt.

2.3 Organpräparation und Probenaufarbeitung

Nachdem die Versuchstiere mittels zervikaler Dislokation unter Isofluran-Narkose getötet wurden, erfolgte die Organentnahme. Dabei wurde zunächst das Abdomen per Längsschnitt median eröffnet und die Gedärme dargestellt. Nach Aufsuchen des Magens erfolgte dessen Abtrennung unmittelbar distal des Ösophagus. Als nächstes suchten wir nach Eröffnung des Beckens das Rektum auf, um dieses am tiefsten Punkt abzusetzen. Daraufhin erfolgte die Entnahme des Magendarmtraktes in toto. Um den Darmtrakt in

voller Länge darzustellen, führten wir eine Adhäsionolyse der einzelnen Abschnitte durch und entrollten den Darm in voller Länge auf einer Maßplatte (**Abb. 5**).

Im Anschluss wurde das aborale Ende in einer Länge von circa 1 cm abgetrennt, dessen distales Ende mit einem Faden markiert und in einer beschrifteten Einbettkassette verstaut. Diese wurde daraufhin in 4 % Formaldehydlösung (ROTI®Histofix 4 %, Carl Roth, Deutschland) für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert, anschließend mit Leitungswasser für eine Stunde gespült und in 70 %-iger Isopropanollösung (PanReac, AppliChem, Deutschland) bei 4 °C bis zur Einbettung in Paraffin (Thermo Fisher Scientific, USA) gelagert.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zusätzlich sogenannte Whole-Mounts mit anschließender immunhistochemischer Färbung angefertigt. Dazu wurde ein circa 1-1,5 cm langes, aborales Dickdarmsstück in eine Sylgard®-Schale mit Krebs-Ringer-Puffer (Krebs-Ringer-Lösung, Bikarbonat-gepuffert, KBS) überführt. Im Anschluss wurde das Darmrohr unter einem Mikroskop (Leica MZ8; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) entlang des Mesoderms eröffnet und längs aufgespannt.

Daraufhin erfolgten eine 10-minütige chemische Fixierung mit 4 % Formaldehydlösung (ROTI®Histofix 4 %, Carl Roth, Deutschland) sowie mehrere Spülungen mit KBS bis zum Ausbleiben von Schlieren. Bei der anschließenden Whole-Mount Präparation wurde die Tunica mucosa (MC) vorsichtig von der darunterliegenden Tunica muscularis externa (ME) gelöst. Nach Entfernung der MC erfolgte ein 20-minütiges Waschen mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) versetzt mit 1 % Triton™ (Thermo Fisher Scientific, USA). Die ME wurde anschließend einer immunhistochemischen Färbung unterzogen (siehe Abschnitt 3.8).

Während im ersten Teil dieser Arbeit das Kolongewebe als Ganzes analysiert wurde, untersuchten wir im zweiten und dritten Teil MC und ME getrennt voneinander. Dafür wurden diese wie unten beschrieben voneinander separiert.

Bei jeder Probenaufarbeitung wurde das Gewebe abgewogen und in mit 500 mg kleinen und acht großen Keramikkügelchen befüllten Probenröhrchen für die einzelnen Analysen verwahrt. Zur Durchführung des *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurden circa 40-70 mg Gewebe untersucht. Um den Zellschaden so gering wie möglich zu halten, wurden die Proben unmittelbar nach dem Abwiegen in flüssigem Stickstoff und dann bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

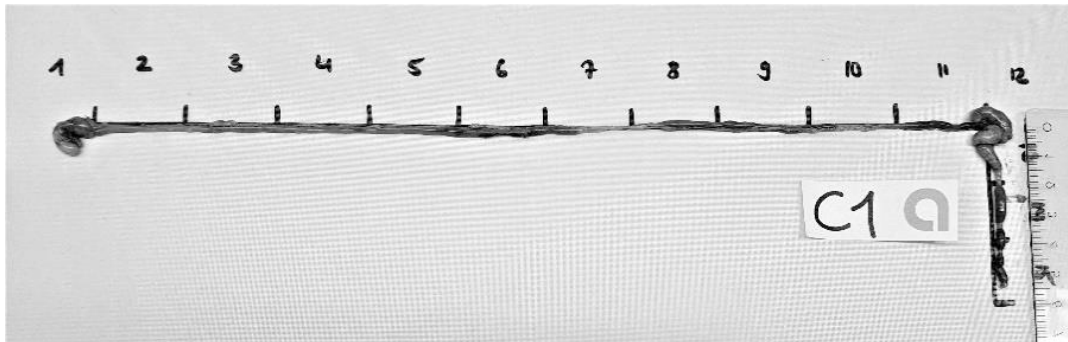


Abb. 5: Darstellung des Magendarmtraktes der Maus. Nach Entnahme des Magendarmkonvoluts vom distalen Ösophagus (links) bis Rektum erfolgt das Anbringen auf einer Maßplatte zur Bestimmung der Kolonlänge.

2.3.1 Separierung von Tunica mucosa und muscularis externa

Die im zweiten und dritten Teil präparierten Dickdarmabschnitte wurden nach der Fotodokumentation in eine Sylgard®-Schale mit KBS überführt und zur besseren Verarbeitung in kleinere Einheiten unterteilt. Nachdem die einzelnen Dickdarmabschnitte auf einen Glasstab gezogen wurden, erfolgte das Stripping. Hierbei wird die ME longitudinal mittels einer spitzen Pinzette durchtrennt und anschließend mithilfe eines angefeuchteten Wattestäbchens vorsichtig und unter leichtem Druck von der darunterliegenden MC gelöst.

2.4 Bestimmung der Kolonlänge

Die Kolonlänge wurde anhand der Fotografien des Kolons auf der Maßplatte mithilfe von ImageJ (ImageJ 1.52a, Wayne Rasband, National Institut of Health, USA, Java 1.8.0-112 (64-bit), 4364K of 64046MB (<1 %)), einem Bildverarbeitungsprogramm, bestimmt. Hierbei wurde jede einzelne Messung [cm] ins Verhältnis zum Durchschnittswert der gleichgeschlechtlichen Kontrollgruppe gesetzt.

Die so ermittelten prozentualen Angaben konnten miteinander verglichen werden.

2.5 Disease Activity Index

Für die Bestimmung des *Disease Activity Index* (DAI, Krankheitsaktivitäts-Index) modifizierten wir die Methode des Papers *Three types of gut bacteria collaborating to improve Kui Jie'an enema treat DSS-induced colitis in mice* von Yu et al (Yu et al. 2019).

Hierbei handelt es sich um einen Wert, der bei Versuchsende eruiert wird und in welchen der Gewichtsverlust am Tag des Todes im Verhältnis zum Ausgangsgewicht und die Kolonlänge einfließen (**Tab. 1**). Die nach unten genannter Tabelle ermittelten Punktzahlen von Gewichtsverlust und Kolonlänge wurden addiert und ergaben den DAI. Die Erkrankungsschwere wird bei einem DAI von 0-1 als gesund, 2-3 als krank und 4-7 als schwer krank eingestuft.

Tab. 1: *Disease Activity Index* (DAI, Krankheitsaktivitätsindex). Die jeweilige Kolonlänge [%] wird ins Verhältnis mit dem Durchschnittswert der gleichgeschlechtlichen Kontrollgruppe gesetzt. Der Gewichtsverlust beschreibt die Gewichtsabnahme am Todestag im Vergleich zu Ausgangsgewicht und wurde hierbei in Anlehnung an das Paper *Three types of gut bacteria collaborating to improve Kui Jie'an enema treat DSS-induced colitis in mice* von Yu et al. bewertet (Yu et al. 2019). Die Addition der einzelnen Punkte ergibt den DAI. Die Erkrankungsschwere wird wie folgt eingestuft: 0-1: gesund, 2-3: krank, 4-7: schwer krank.

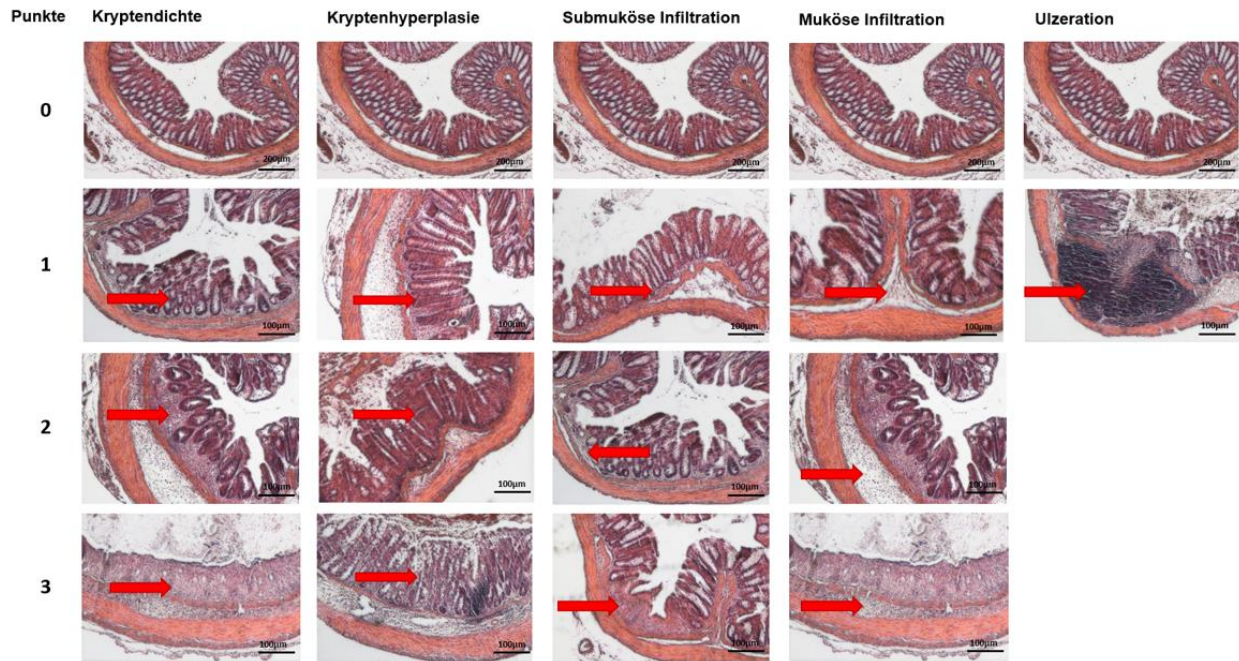
	Definition	Punkteverteilung
Kolonlänge [%]	≥ 90	0
	80 - 89	1
	70 - 79	2
	< 70	4
Gewichtsverlust [%]	< 0	0
	1 – 5	1
	10 – 20	2
	> 20	3

2.6 Mouse Colitis Histology Index

Typische Merkmale einer durch DSS-induzierten Kolitis sind eine verminderte Anzahl an Becherzellen, epitheliale Erosionen und Ulzerationen, immunologische Zellinfiltrate in Lamina propria mucosae und Submucosa sowie Kryptenabzesse (Chassaing et al. 2014). Zur Interpretation der histologischen Veränderungen, haben wir eine modifizierte Analyse des Papers *Development of Reliable, Valid and Responsive Scoring Systems for Endoscopy and Histology in Animal Models for Inflammatory Bowel Disease* von Koelink et al. durchgeführt (Koelink et al. 2018). Dabei wurden pro Tier fünf Paraffinschnitte des Kolons nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung (siehe Abschnitt 3.7) in 4- und 10-facher Vergrößerung mikroskopiert und die Parameter Kryptendichte, Kryptenhyperplasie, submuköse Infiltrate, muköse Infiltrate sowie das Vorliegen von Ulzera analysiert (**Abb.**

6). Für die einzelnen Parameter wurden nach unten genanntem Schema Punkte vergeben und diese pro Paraffinschnitt addiert. Die MCHI-Werte lagen pro Paraffinschnitt zwischen 0 und 13 Punkten und wurden für jedes Versuchstier zu einem Mittelwert zusammengefasst.

A



B

Punkte	Kryptendichte	Kryptenhyperplasie	Submuköse Infiltration	Muköse Infiltration	Ulzeration
0	Abnahme < 10%	Keine	Keine	Keine	Keine
1	Abnahme 10 – 50%	Leicht	Einzelne Zellen	Einzelne Zellen	Vorhanden
2	Abnahme 50 – 80%	2-3-fach	Infiltrate	Infiltrate	
3	Abnahme > 80%	> 3-fach	Ausgedehnte Infiltrate	Ausgedehnte Infiltrate	

Abb. 6: *Mouse Colitis Histology Index* (MCHI, Histologischer Index). Zur Interpretation histologischer Veränderungen bei DSS-induzierter Kolitis. **(A)** Hier sind beispielhaft lichtmikroskopische Aufnahmen des Kolons im Querschnitt nach H.E. Färbung in 10- und 20-facher Vergrößerung dargestellt. Die roten Pfeile zeigen dabei jeweils den hier zu betrachtenden, auffälligen Parameter. Untersucht wurden die histologischen Parameter Kryptenhyperplasie, submuköse Infiltration, muköse Infiltration und Ulzeration. Die Punkteverteilung ist links abgebildet. **(B)** Tabellarische Darstellung der einzelnen Parameter mit Punkteverteilung. Zur Analyse wurde eine modifizierte Methode des Papers *Development of Reliable, Valid and Responsive Scoring Systems for Endoscopy and Histology in Animal Models for Inflammatory Bowel Disease* von Koelink et al. herangezogen (Koelink et al. 2018).

2.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Pro Versuchstier wurden zwei Objektträger mit je 5-8 Präparaten gefärbt, um für die Analyse fünf gelungene Gewebeschnitte heranzuziehen. Dafür wurden zunächst 5 µm dicke Schnitte der in Paraffin eingebetteten Präparate angefertigt. Nach dem Deparaffinieren mittels einer aufsteigenden und absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70 %, 90 %, 98 %) sowie Xylol, erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin nach dem Protokoll der Firma Roth (H&E-Schnellfärbekit, Firma Roth, Deutschland). Nach Eindeckung mit Entellan (Firma Sigma Aldrich, Deutschland) und Trocknung, erfolgte die oben genannte Auswertung unter einem Lichtmikroskop (Nikon, Model T-HUBC, eclipse TE2000-E, Japan). Dazu wurden alle Schnitte bei einer 4- und 10-fachen Vergrößerung fotografiert und fünf zufällig ausgewählte Kolonschnitte nach oben genannter Tabelle ausgewertet.

2.8 Immunhistochemische Färbung der Whole-Mounts

Die Immunhistochemie (IHC) dient der Darstellung einzelner Proteine im Gewebe unter Erhalt der Mikrostruktur. Bei diesem Verfahren auf Antikörperbasis wird eine direkte Methode, bei welcher der Antikörper direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, von einer indirekten Methode unterschieden. Bei letzterer werden zwei Antikörper verwendet, bei der der primäre Antikörper an das Antigen und der sekundäre, markierte Antikörper an den primären bindet. So kommt es zu einer höheren Signalintensität.

Wir wandten diese Färbemethode zur Detektion des glialen Proteins S100-b, des Proliferationsmarkers Ki-67 sowie MHC-II an. Das ME-Präparat wurde zunächst für zwei Stunden in einer *Blocking*-Lösung (5 % Esel-Serum und 0,25 % Triton gelöst in PBS) und anschließend für eine Stunde in der ersten Antikörperlösung inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen mit PBS wurde das Präparat anschließend mit der zweiten Antikörperlösung versetzt. Nach Abspülen des Reagenzes mit PBS, wurde das Präparat für circa 10 Minuten einer 5 ng/ml Lösung des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst 33342 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, USA) ausgesetzt. Hoechst bindet an DNA und macht die Zellkerne sichtbar.

Nach erneutem Spülen mit PBS erfolgten schließlich das Eindecken auf einem Objektträger (*Microscope Slides* der Firma Paul Marienfeld GmbH & Co, Deutschland) mit dem Eindeckmittel Aquatex® (Merck KGaA, Deutschland) und die Trocknung des

Präparats. Für die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Nikon, Model T-HUBC, eclipse TE2000-E, Japan) wurden pro Tier drei zufällig ausgewählte Bereiche bei 20-facher Vergrößerung fotografiert und alle Ki-67- und S100-b-doppel-positiven sowie MHC-II-positive Zellen eines Bildes ausgezählt. Im Anschluss wurde für jedes Tier der Mittelwert berechnet. Alle Antikörperlösungen wurden frisch zubereitet. Die verwendeten Antikörper sind in **Tab. 2** dargestellt.

Tab. 2: Verwendete primäre (**A**) und sekundäre (**B**) Antikörper. Hier dargestellt jeweils mit Ziel-Protein, Herkunft, Ziel-Spezies, Wellenlänge und Herstellerinformationen.

A

Primäre Antikörper		
<u>Ziel-Protein</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Herstellerinformation</u>
Ki-67	Hase	Artikelnummer AB16667, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
MHC-II	Ratte	Artikelnummer 107602, BioLegend, San Diego, USA
S100-b	Meerschweinchen	Artikelnummer 287004, Synaptic Systems GmbH, Göttingen, Deutschland

B

Sekundäre Antikörper		
<u>Ziel-Spezies</u>	<u>Wellenlänge</u>	<u>Herstellerinformation</u>
Anti-Meerschweinchen	Alexa Fluor® 647	Artikelnummer AB150187, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Ratte	Alexa Fluor™ 488	Artikelnummer A21208, Thermo Fisher Scientific, USA
Anti-Hase	Alexa Fluor™ 555	Artikelnummer A31572, Thermo Fisher Scientific, USA

2.9 Proteinisolation

Zur Proteinisolation wurden alle tiefgefrorenen Gewebestücke aufgetaut und in einem Gewebehomogenisator (Precellys® 24-Peqlab, Erlangen, Deutschland) in PBS mit 2 mM EDTA, 2 mM EGTA und einer 0,5 % Protease hemmenden Mischung (#P8340, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurden die Proben mit einem *Radio Immune Precipitation* (RIPA) Lyse- und Extraktionspuffer versetzt, per Ultraschallstab mit einer Leistung von 20 % für 10 Sekunden sonifiziert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurden die Proben in 5-minütigem Abstand

gemischt. Im Anschluss erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation mit 15.000 x g bei 4 °C. Schließlich wurde der Überstand in sterile Kryoröhrchen überführt.

Um bei einem ELISA eine gleichwertige Menge an Protein pro Tier verwenden zu können, wurde vor jeder Analyse eine Proteinbestimmung durchgeführt. Hierzu erfolgten der Ansatz einer Standardreihe und die Proteinquantifizierung mit einem Spektralphotometer (Magellan 3, Safire, Tecan GmbH, Schweiz) bei 562 nm nach Anleitung des Pierce® *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, USA).

So konnten alle Proben mit den jeweils ausgerechneten Volumina verdünnt und die gleiche Menge an Protein für die nachfolgenden Analysen vorausgesetzt werden.

2.10 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

Zur Untersuchung der Proteinlevel verschiedener Zytokine in ME und MC zusammen (erster Teil) und separiert (zweiter und dritter Teil), wurden *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) durchgeführt. Dabei verwendeten wir zur Konzentrationsbestimmung von IL-6 und TNF- α [pg/mg Protein] Ready-SET-Go® ELISA Kits (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben.

2.11 Verwendete Chemikalien und Lösungen

Der Krebs-Ringer-Puffer (KBS) wurde in der Zusammensetzung von 120 mM Natriumchlorid, 5,9 mM Kaliumchlorid, 15,5 mM Natriumhydrogencarbonat, 1,4 mM Natriumhydrogenphosphat, 17,5 mM Glucose, 1,7 M Calciumchloridhydrat und 1,2 mM Magnesiumchloridhydrat eingesetzt. Zur Herstellung der Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) wurde eine PBS-Tablette (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA) in 500 ml destilliertem Wasser gelöst, wodurch sich für den Puffer die folgende Zusammensetzung ergab: 10 mM Gesamt-Phosphat, 2,68 mM Kaliumchlorid, 140 mM Natriumchlorid. Als RIPA-Puffer wurde der Puffer von Pierce™ (Thermo Scientific, USA) bestehend aus 25 mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 1 % Natriumdeoxycholat und 0.1 % SDS verwendet.

Alle anderen verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angemerkt, von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

2.12 Statistische Datenanalyse

Für die statistische Datenanalyse wurde das Programm Prism V8.3.0 (GraphPad, San Diego, USA) verwendet. Dabei erfolgte die Auswertung entweder anhand einer one-way ANOVA mit anschließendem Tukey Post-hoc Test, einer two-way ANOVA mit anschließendem Tukey Post-hoc Test oder eines zweiseitigen, ungepaarten T-Tests. Dargestellt wurden die Einzelwerte und der Mittelwert \pm *Standard Error of Mean* (SEM), wobei die Signifikanzen mit $*=p<0,05$, $**=p<0,01$ und $***=p<0,001$, $****=p<0,0001$ zwischen den angezeigten Gruppen angegeben wurden.

3. Ergebnisse

3.1 DSS-Kolitis in Wildtyp-Mäusen

Die Wirkung von DSS wurde bereits in diversen Forschungsarbeiten beschrieben. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit des DSS-Modells wird dieses zur Induktion einer Kolitis im Tier angewendet. In der Literatur finden sich zahlreiche Versuchsregime mit unterschiedlichen Konzentrationen und Applikationszeiträumen. Für unsere Experimente erhielten die Versuchstiere 3 % DSS-Wasser für fünf Tage und wurden anschließend für weitere zwei (DSS 5+2) oder sieben (DSS 5+7) Tage beobachtet, in die Mäuse autoklaviertes Leitungswasser erhielten. Neben den behandelten Mäusen wurden stets Kontrolltiere betrachtet, welche für die gesamte Versuchsdauer autoklaviertes Leitungswasser bekamen.

Während des Beobachtungszeitraums wurde der Gewichtsverlauf im Vergleich zum Ausgangsgewicht an Tag 0 festgehalten (**Abb. 9A**). Wie in vorangegangenen Studien zeigten alle DSS-Mäuse im Verlauf einen signifikanten Gewichtsverlust verglichen mit der Kontrollgruppe (DSS 5+2 $p < 0,01$, 5+7 DAI \leq 1 $p < 0,01$, 5+7 DAI \geq 2 $p < 0,0001$). Die Gruppe der DSS 5+7 wurde ab Tag 8 gemäß ihrem DAI in 5+7 DAI \leq 1 und DAI \geq 2 separiert, da die DSS 5+7 DAI \leq 1 Gruppe eine schnellere Erholung des Gewichts im Vergleich zu 5+7 DAI \geq 2 ($p < 0,01$) zeigte. Bei den Kontrollen konnte keine Gewichtsabnahme festgestellt werden.

Neben dem Gewichtsverlust wiesen einige DSS-Mäuse wässrige oder blutige Diarrhöen sowie teilweise einen geröteten, entzündeten Anus auf.

Nach der Euthanasie erfolgte die Entnahme des Magen-Darm-Traktes und Darlegung des Kolons mit anschließender Längenbestimmung (**Abb. 7**). Im Vergleich zu den Kontrollmäusen wiesen DSS 5+2 (74 ± 2 vs. 100 ± 3 %, $p < 0,0001$) und DSS 5+7 DAI \geq 2 (85 ± 3 vs. 100 ± 3 %, $p < 0,01$) reduzierte Kolonlängen auf, wohingegen sich bei DSS 5+7 DAI \leq 1 kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen zeigte ($p = 0,97$). Zwischen den einzelnen DSS-Gruppen lagen keine signifikanten Unterschiede vor (**Abb. 9B**).

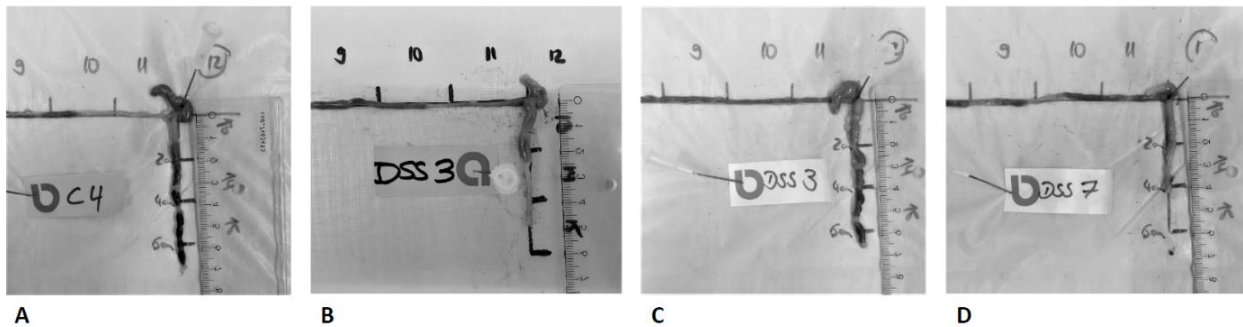


Abb. 7: Darstellung des Kolons auf einer Maßplatte zur Längenbestimmung in cm. Die Bilder zeigen horizontal verlaufend einen Abschnitt des Dünndarmes und vertikal verlaufend das Kolon. Rechts neben dem Kolon liegt jeweils ein Lineal. Hier beispielhaft zu sehen sind Kontrollgruppe **(A)**, DSS 5+2 **(B)**, DSS 5+7 $DAI \leq 1$ **(C)** und $DAI \geq 2$ **(D)**.

Die Krankheitsgrade gemäß dem DAI in den jeweiligen Gruppen sind in **Abb. 8** dargestellt. Die einzelnen Werte des DAI werden in **Abb. 9C** gezeigt. Die Krankheitsindices von DSS 5+2 deuten darauf hin, dass 3 % DSS bei allen Mäusen zu einer Kolitis führte, wobei 82,6 % der Mäuse schwer erkrankten. Die DAI der 5+7 DSS-Mäuse hingegen zeigten eine größere Verteilungsbreite. Aus den unten aufgeführten Daten lässt sich schließen, dass sich 37 % ($DAI \leq 1$) bereits wieder erholt hatten während die übrigen 63 % ($DAI \geq 2$) noch immer krank waren. Die Werte von DSS 5+2 und 5+7 unterschieden sich dabei signifikant ($p < 0,0001$). Die Kontrollmäuse waren erwartungsgemäß gesund mit einem $DAI \leq 1$.

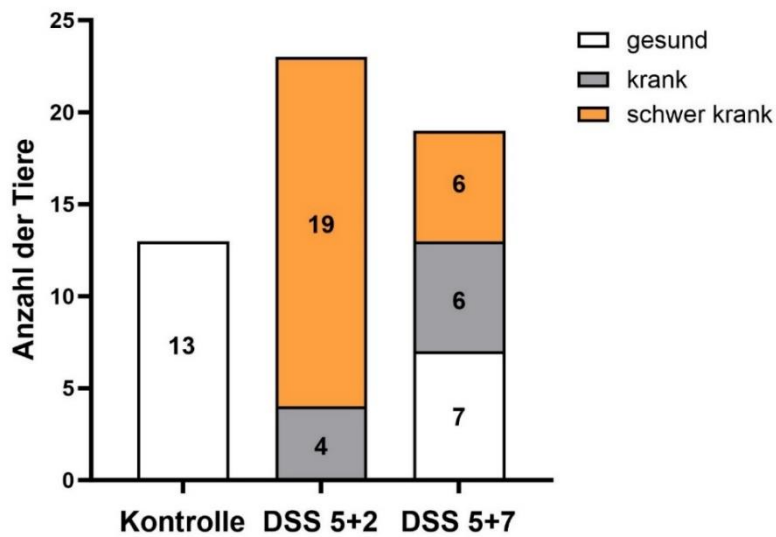


Abb. 8: Krankheitsgrade gemäß dem *Disease Activity Index* bei Wildtyp-Mäusen. Dargestellt ist die Anzahl der Tiere unterteilt in die Krankheitsgrade in den Gruppen Kontrolle (n=13), DSS 5+2 (n=23) und DSS 5+7 (n=19). Hierbei werden die Grade gesund (DAI=0-1), krank (DAI=2-3) und schwer krank (DAI= \geq 4) unterschieden. Der DAI setzt sich aus den Parametern Kolonlänge und Gewichtsveränderung am Todestag zusammen. Für beide Parameter wurden Punkte vergeben und addiert. Hierzu wurde eine modifizierte Methode der Publikation *Three types of gut bacteria collaborating to improve Kui Jie'an enema treat DSS-induced colitis in mice* von Yu et al. angewandt (Yu et al. 2019). DSS=Dextran-Sulfat-Natrium.

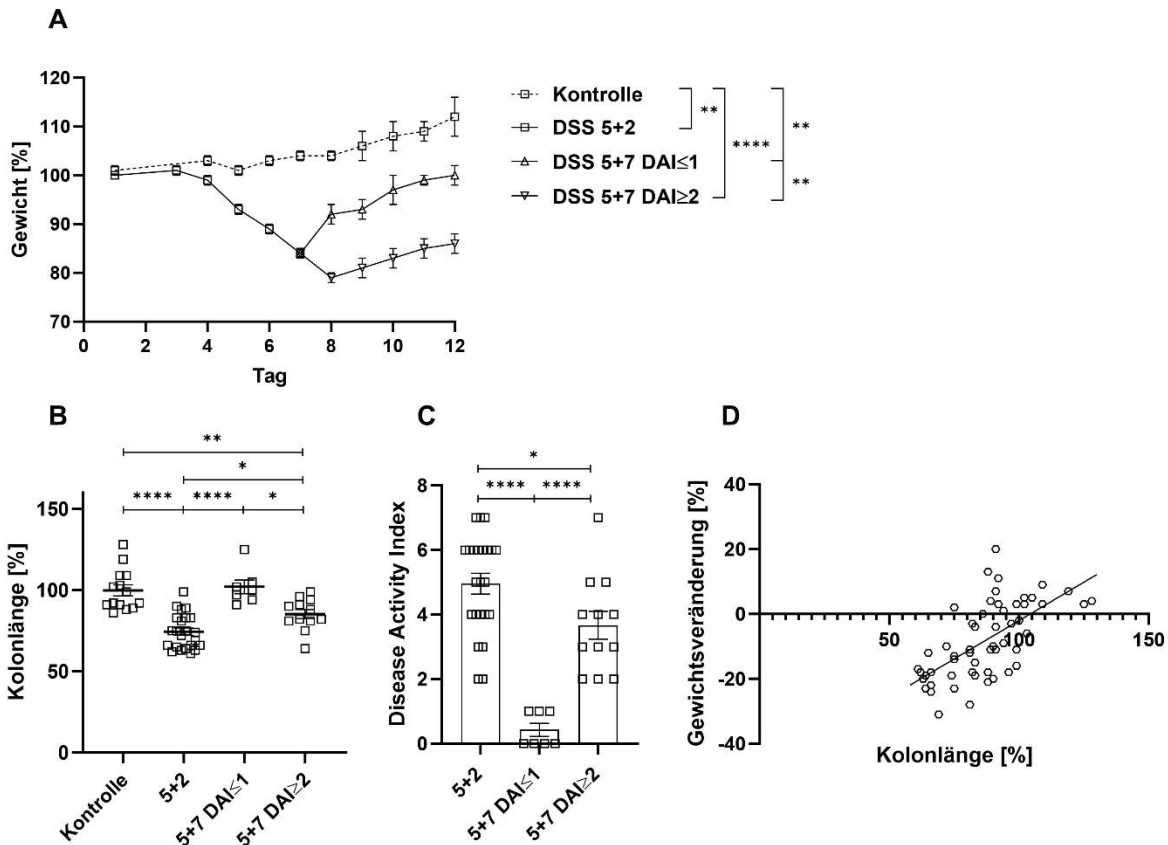


Abb. 9: Effekt von 3 % DSS auf Kolonlänge, Gewicht und *Disease Activity Index* bei Wildtyp-Mäusen. **(A)** Untersuchung des Gewichts im Vergleich zum Ausgangsgewicht an Tag 0. Von Tag 1 bis Tag 7 befinden sich alle DSS-Mäuse in einer Gruppe. Nach Operierung der DSS 5+2 Mäuse an Tag 7, werden DSS 5+7 nach ihrem DAI in die zwei Gruppen DSS 5+7 DAI≤1 und DAI≥2 unterteilt. **(B)** Bestimmung der Kolonlänge in Prozent, wobei jede gemessene Kolonlänge mit dem Mittelwert der gleichgeschlechtlichen Kontrollen ins Verhältnis gesetzt wurde. **(C)** Darstellung der einzelnen DAI-Werte. **(D)** Korrelation nach Pearson zwischen Kolonlänge und Gewichtsveränderung am Todestag mit einem Korrelationskoeffizienten r von 0,64, r^2 von 0,42 und $p < 0,0001$. Jeweils dargestellt sind die Gruppen Kontrolle ($n=14$), DSS 5+2 ($n=23$), DSS 5+7 DAI≤1 ($n=7$) und DSS 5+7 DAI≥2 ($n=12$). 5+2=DSS 5+2; 5+7 DAI≤1=DSS 5+7 DAI≤1; 5+7 DAI≥2=DSS 5+7 DAI≥2. DSS=Dextran-Sulfat-Sodium; DAI=Disease Activity Index. Statistische Auswertung mittels einer one-way ANOVA mit Darstellung als einzelne Werte und Mittelwert \pm SEM mit *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$ und ****= $p < 0,0001$ zwischen den Gruppen.

Da eine Kolitis mit einer Gewebeeränderung einhergeht, führten wir zusätzlich eine histologische Analyse mittels einer modifizierten Methode von Koelink et al. durch. Wie in **Abb. 10A** dargestellt, ergaben sich für DSS 5+2 ($10 \pm 1,1$ vs. $1 \pm 0,3$ P, $p < 0,0001$) und 5+7 DAI≥2 ($9 \pm 0,8$ vs. $1 \pm 0,3$ P, $p < 0,0001$) signifikant erhöhte Werte verglichen mit den

Kontrollen, was auf einen gesteigerten Entzündungsprozess mit vermehrter Gewebsdestruktion schließen lässt. Dabei wurde für DSS 5+7 DAI<1 keine histologische Interpretation vorgenommen, da die Versuchstiere mit akutem Entzündungsprozess von vermehrtem Interesse waren. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen dem *Mouse Colitis Histology Index* (MCHI) und dem DAI ($p < 0,0001$) (**Abb. 10B**).

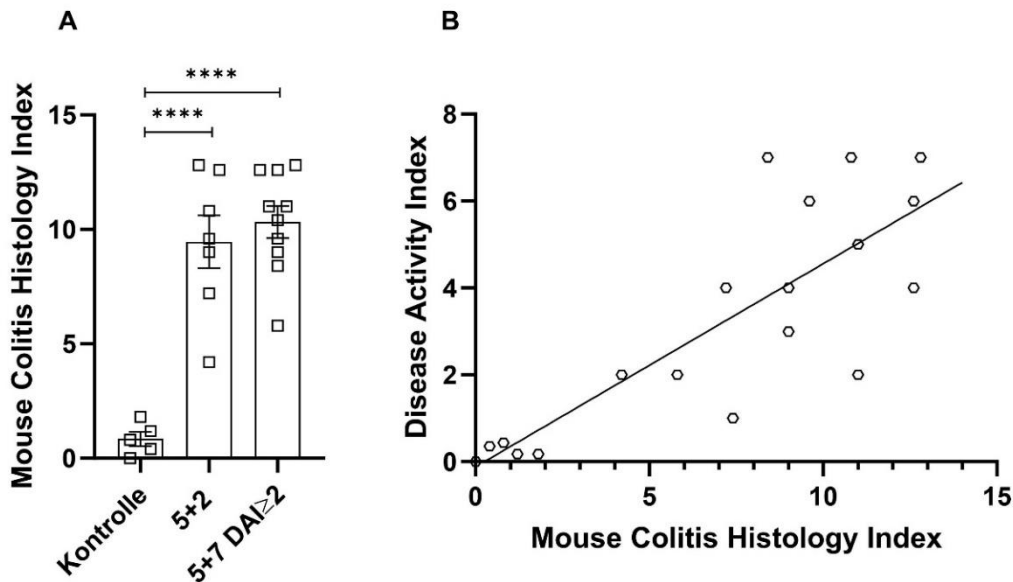


Abb. 10: *Mouse Colitis Histology Index* nach 3 % DSS bei Wildtyp-Mäusen)

(A) Darstellung des MCHI basierend auf Kryptendichte, Kryptenhyperplasie, Ulzera sowie submukösen und mukösen Infiltraten. Dabei wurden neben einer Kontrollgruppe (n=5) die Gruppen DSS 5+2 (n=7) und 5+7 DAI \geq 2 (n=10) betrachtet, da die histologischen Veränderungen im akuten Krankheitsstadium von besonderem Interesse waren. Zur histologischen Analyse verwendeten wir eine modifizierte Methode des Papers *Development of Reliable, Valid and Responsive Scoring Systems for Endoscopy and Histology in Animal Models for Inflammatory Bowel Disease* von Koelink et al. (Koelink et al. 2018). **(B)** Korrelation nach Pearson zwischen MCHI und DAI mit einem Korrelationskoeffizienten r von 0,82, r^2 von 0,67 und $p < 0,0001$. 5+2=DSS 5+2; 5+7 DAI \geq 2=DSS 5+7 DAI \geq 2. DAI=Disease Activity Index. Statistische Auswertung mittels einer one-way ANOVA mit Darstellung als einzelne Werte mit Mittelwert \pm SEM mit *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$ und ****= $p < 0,0001$ zwischen den Gruppen.

Neben der histologischen Analyse aller Kolonschichten, erfolgten die Präparation und anschließende Antikörper-Färbung von Whole-Mount Präparaten, um den Einfluss von 3 % DSS auf die Proliferation von EGZ in der ME zu untersuchen. Dazu wurden pro Tier proliferierenden Zellen mittels Anti-Ki-67 und EGZ mittels Anti-S100-b markiert. Doppel-

positive Zellen wurden als proliferierende EGZ quantifiziert. Pro Tier wurden drei Präparatbereiche zufällig ausgewählt und die Bilder hinterher ausgezählt. Die Anzahl der MHC-II-positiven Zellen wurde ebenfalls festgehalten und diente als Indikator für das Ausmaß der Immunzellen-Präsenz im Gewebe. Die Auszählung der Ki-67- und S100-b-doppel-positiven Zellen ergab für DSS 5+2 (24 ± 7 vs. $2 \pm 0,4$ Zellen pro Fläche, $p < 0,05$) und 5+7 DAI \geq 2 (36 ± 14 vs. $2 \pm 0,4$ Zellen pro Fläche, $p < 0,01$) eine erhöhte Anzahl proliferierender EGZ verglichen mit der Kontrollgruppe (**Abb. 11A**). Für DSS 5+7 DAI \leq 1 ($p > 0,9$) und zwischen den einzelnen DSS-Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Zudem zeigte sich bei allen DSS-Tieren eine erhöhte MHC-II⁺ Zellzahl (**Abb. 11B**), die bei DSS 5+2 (218 ± 39 vs. 46 ± 6 Zellen pro Fläche, $p < 0,01$) und 5+7 DAI \geq 2 (211 ± 44 vs. 46 ± 6 Zellen pro Fläche, $p < 0,05$) signifikant erhöht war. Für DSS 5+7 DAI \leq 1 konnte lediglich eine geringfügig, aber nicht signifikant erhöhte Immunzellzahl festgestellt werden ($p > 0,7$).

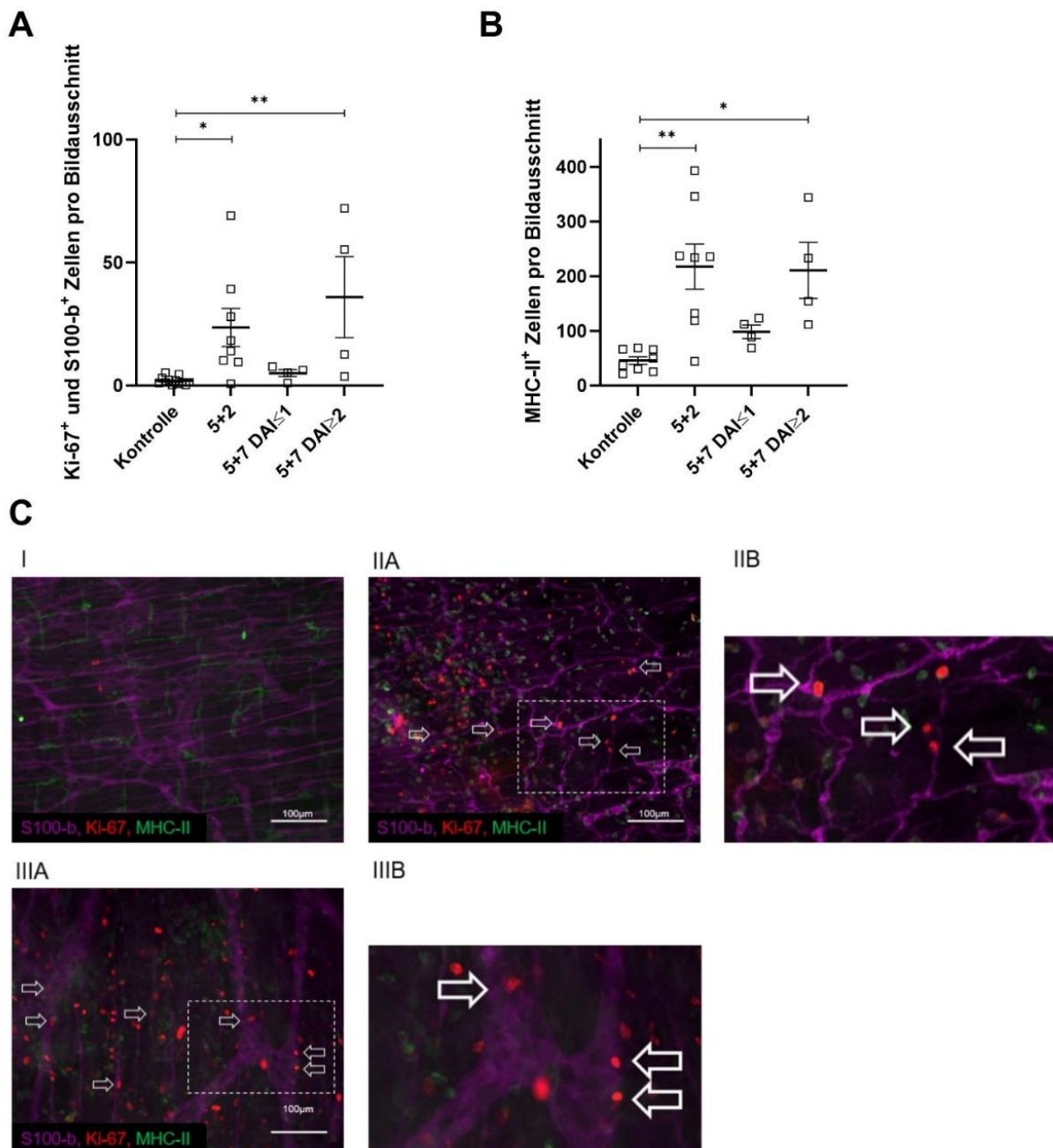


Abb. 11: Effekt von 3 % DSS auf die Proliferation der enterischen Gliazellen in der Tunica muscularis externa bei Wildtyp-Mäusen. **(A)** Zählung von Ki-67- und S100-b-doppel-positiven Zellen pro Bildausschnitt in den Gruppen Kontrolle (n=12), DSS 5+2 (n=8), DSS 5+7 DAI \leq 1 (n=4) und DSS 5+7 DAI \geq 2 (n=4). **(B)** Zählung von MHC-II-positiven Zellen pro Bildausschnitt in den Gruppen Kontrolle (n=8), DSS 5+2 (n=8), DSS 5+7 DAI \leq 1 (n=4) und DSS 5+7 DAI \geq 2 (n=4). **(C)** Whole-Mounts nach Immunfluoreszenzfärbung. Darstellung von Kontrolle (I), DSS 5+2 (IIA) und DSS 5+7 DAI \geq 2 (IIIA) in 20-facher Vergrößerung. Daneben sind zwei digitale Vergrößerungen von DSS 5+2 (IIB) und DSS 5+7 DAI \geq 2 (IIIB) der jeweils umrandeten Bereiche aus IIA und IIB dargestellt. Die weißen Pfeile zeigen exemplarisch Ki-67- und S100-b-doppel-positiv Zellen. Zur immunhistochemischen Färbung verwendeten wir die primären Antikörper rbKi-67, gpS100-b und rtMHC-II und

sekundären Antikörper rb-Cy3, rt-Cy2 und gp-Cy5. 5+2=DSS 5+2; 5+7 DAI \leq 1=DSS 5+7 DAI \leq 1; 5+7 DAI \geq 2=DSS 5+7 DAI \geq 2. DAI=*Disease Activity Index*; MHC-II=Haupthistokompatibilitätskomplex Typ II; rb=Hase; rt=Ratte; gp=Meerschweinchen. Statistische Analyse mittels einer one-way ANOVA mit Darstellung von Einzel- und Mittelwerten \pm SEM mit *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001 und ****=p<0,0001 zwischen den Gruppen.

Entzündungsreaktionen wie sie im Rahmen von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn entstehen, werden von einer (lokalen) Konzentrationserhöhung proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-6, TNF- α und IL-1 β begleitet (Ungaro et al. 2017). Um die Auswirkungen von 3 % DSS zu untersuchen, wurden die Gewebeproteinlevel der Zytokine IL-6 und TNF- α im Kolon (hier MC und ME zusammen) bestimmt (**Abb. 12**).

Verglichen mit den Kontrollmäusen zeigten sowohl DSS 5+2 als auch 5+7 DAI \geq 2 erhöhte Konzentrationen von IL-6 (DSS 5+2: 684 \pm 105 vs. 194 \pm 10 pg/mg Protein, p<0,05; DSS 5+7 DAI \geq 2: 790 \pm 137 vs. 194 \pm 10 pg/mg Protein, p<0,05). Bei DSS 5+7 DAI \geq 2 konnten zudem signifikant höhere TNF- α -Level als bei der Kontrollkohorte gemessen werden (DSS 5+7 DAI \geq 2: 296 \pm 34 vs. 149 \pm 8 pg/mg Protein, p<0,01).

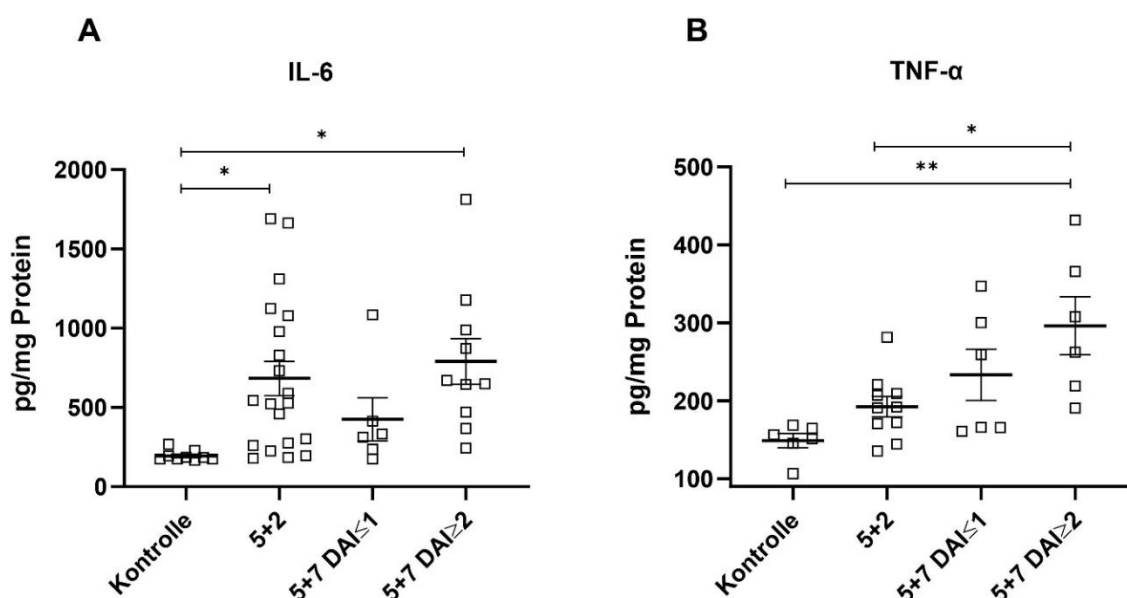


Abb. 12: Gewebeproteinlevel von IL-6 und TNF- α nach 3 % DSS bei Wildtyp-Mäusen. Die Konzentrationen im Kolongewebe (MC und ME gemeinsam) wurden mittels ELISA nach BCA-Messung bestimmt. **(A)** Bestimmung der Konzentration von IL-6 in den Gruppen Kontrolle (n=9), DSS 5+2 (n=20), DSS 5+7 DAI \leq 1 (n=6) und DSS 5+7 DAI \geq 2 (n=10). **(B)** Bestimmung der Konzentration von TNF- α in den Gruppen Kontrolle (n=6),

DSS 5+2 (n=10), DSS 5+7 DAI \leq 1 (n=6) und DSS 5+7 DAI \geq 2 (n=6). 5+2=DSS 5+2; 5+7 DAI \leq 1=DSS 5+7 DAI \leq 1; 5+7 DAI \geq 2=DSS 5+7 DAI \geq 2. DAI=*Disease Activity Index*. Statistische Auswertung mittels einer one-way ANOVA mit Darstellung als Einzel- und Mittelwerte \pm SEM mit *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$ und ****= $p < 0,0001$ zwischen den Gruppen.

Zusammengefasst zeigen die gewonnenen Daten des ersten Teils dieser Arbeit, dass die Gabe von 3 % DSS zur Induktion einer Kolitis führt, welche mit einem Gewichtsverlust, einer Kolonverkürzung, histologischen Veränderungen, einer Konzentrationserhöhung von IL-6 und TNF- α im Gewebe sowie einer gesteigerten Proliferation S100-b⁺ EGZ und einer Zunahme MHC-II⁺ Zellen in der ME einhergeht. Interessanterweise erholte sich nur ein Teil der DSS-behandelten Mäuse nach initialem Gewichtsverlust von der Kolitis, was sich durch eine Gewichtszunahme ab Tag 8, einer Normalisierung der Kolonlänge, einer Reduktion der IL-6 Level und einer verminderten Proliferation der EGZ zeigte. Da diese Erholung bei anderen Mäusen ausblieb, haben wir die DSS 5+7 Gruppe im weiteren Verlauf in zwei Subgruppen aufgeteilt, die sich durch einen niedrigen (DAI \leq 1) oder erhöhten DAI (DAI \geq 2) unterschieden.

3.2 Die Untersuchung des Effektes von 3 % DSS in GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} Mäusen

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass EGZ über MyD88-assoziierte Rezeptoren wie den IL-1R1 oder TLR eine wichtige Rolle in der Entstehung des POI spielen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der EGZ über die oben genannten Rezeptoren auf den Verlauf einer Kolitis zu untersuchen. Dazu wendeten wir das DSS-Modell bei Mäusen mit und ohne das Adapterprotein MyD88 in EGZ an. Im Anschluss verglichen wir DSS- und Kontroll-Mäuse aus den transgenen Mauslinien GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} miteinander.

Vorab ist anzumerken, dass es in keiner Untersuchung zu signifikanten Unterschieden zwischen den unbehandelten Tieren beider Genotypen (GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl}) kam.

Wie zu erwarten zeigten alle behandelten Tiere im Verlauf Diarrhö und Gewichtsverlust im Vergleich zum Ausgangsgewicht (**Abb. 14A**). Hierbei konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen beobachtet werden. Eine kleine Anzahl GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} DSS-Mäuse

wurde aufgrund eines sehr schlechten Allgemeinzustandes verfrüht aus dem Experiment entfernt.

Die Kolonlängenbestimmung ergab für alle DSS 5+2 (Cre⁻: 74±4 vs 100±2 %, p<0,0001; Cre⁺: 74±3 vs. 100±5 %, p<0,01) und 5+7 DAI≥2 der GFAP-Cre⁻ x MyD88^{fl/fl} Tiere (82±5 vs. 100±2 %, p<0,01) ein verkürztes Kolon im Vergleich zu den Kontrollen. Daneben wiesen alle Mäuse der Gruppe DSS 5+7 DAI≤1 (Cre⁻: p>0,8; Cre⁺: p>0,6) sowie 5+7 DAI≥2 der GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} Tiere (p>0,3) keine signifikante Kolonverkürzung auf (**Abb. 14B**). Zwischen GFAP-Cre⁻ x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} ließ sich lediglich in der Gruppe DSS 5+7 DAI≤1 (95±3 vs. 109±4 %, p<0,05) ein signifikanter Unterschied feststellen.

Die DAI wiesen darauf hin, dass zum Todeszeitpunkt alle Kontrollen gesund, alle Tiere der Gruppe DSS 5+2 erkrankt und Mäuse der Gruppe DSS 5+7 teils erkrankt und teils gesund waren (**Abb. 13**). Beim Betrachten der DSS 5+2 Mäuse zeigte sich, dass 90 % der GFAP-Cre⁻ x MyD88^{fl/fl} Tiere (n=11) schwer erkrankt waren, während dies bei nur 55 % der GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} Cre⁺ Mäuse (n=9) der Fall war. Dennoch unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant voneinander (p>0,9). Beide DSS 5+7 Versuchstiergruppen umfassten gesunde, kranke und schwer kranke Mäuse ohne

signifikante Abweichungen zwischen den Genotypen. Die einzelnen DAI-Werte der behandelten Tiere sind in **Abb. 14C** dargestellt.

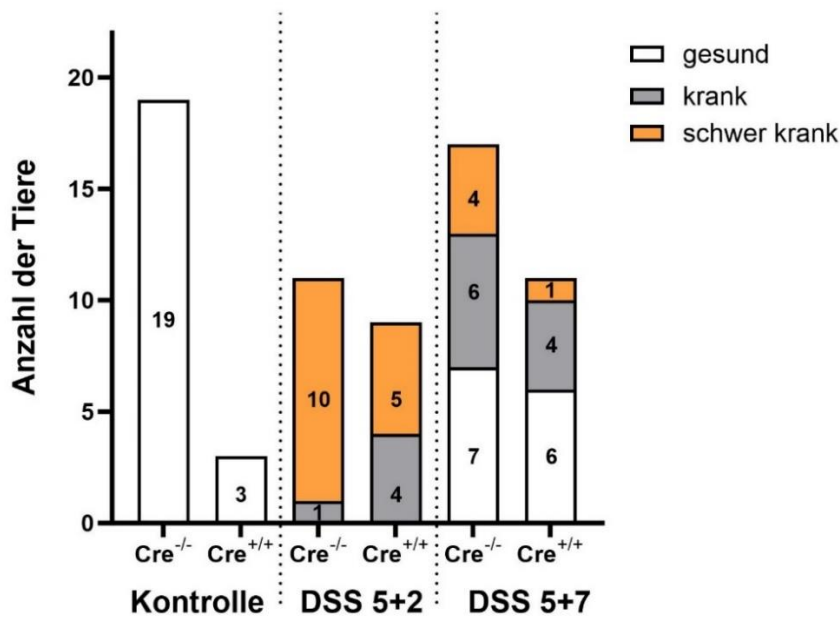


Abb. 13: Krankheitsgrade gemäß dem *Disease Activity Index* von GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} Mäusen. Darstellung der Anzahl der Tiere unterteilt nach Krankheitsgrad in den Gruppen Kontrolle (Cre^{-/-}: n=19, Cre^{+/+}: n=3), DSS 5+2 (Cre^{-/-}: n=11, Cre^{+/+}: n=9) und DSS 5+7 (Cre^{-/-}: n=17, Cre^{+/+}: n=11). Hierbei werden die Grade gesund (DAI=0-1), krank (DAI=2-3) und schwer krank (DAI=≥4) unterschieden. DSS=*Dextran-Sulfat-Sodium*.

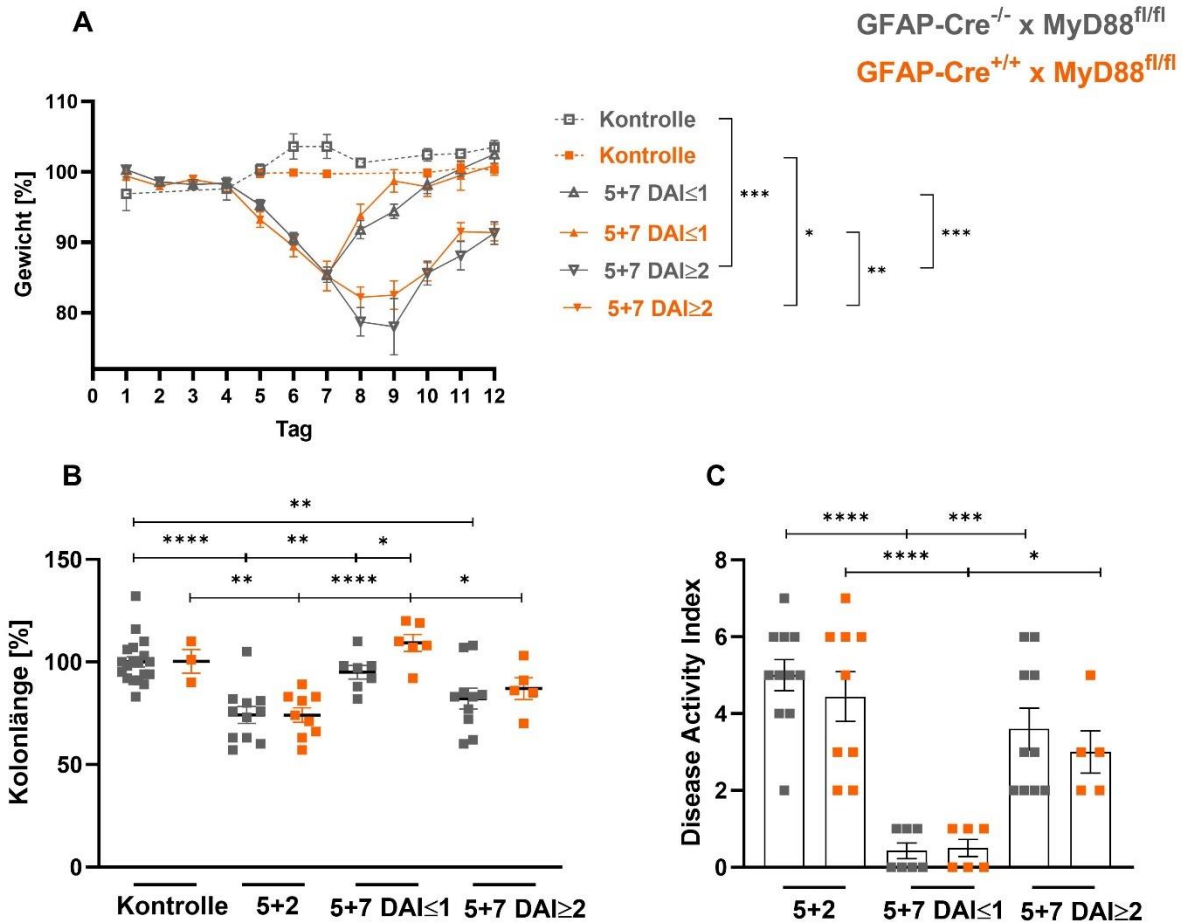


Abb. 14: Effekt von 3 % DSS auf Kolonlänge, Gewichtsveränderung und *Disease Activity Index* in GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} Mäusen.

(A) Gewichtsveränderung im Vergleich zum Ausgangsgewicht an Tag 0. **(B)** Darstellung der Kolonlänge in Prozent. Hierbei wurde die individuelle Kolonlänge in Relation zu dem Mittelwert der gleichgeschlechtlichen Kontrollgruppe gesetzt. **(C)** DAI-Werte in den Gruppen. Dargestellt sind jeweils die Gruppen Kontrolle (Cre⁻: n=19, Cre⁺: n=3), DSS 5+2 (Cre⁻: n=11, Cre⁺: n=9), DSS 5+7 DAI≤1 (Cre⁻: n=7, Cre⁺: n=6) und DSS 5+7 DAI≥2 (Cre⁻: n=10, Cre⁺: n=5). 5+2=DSS 5+2; 5+7 DAI≤1=DSS 5+7 DAI≤1; 5+7 DAI≥2=DSS 5+7 DAI≥2. DAI=*Disease Activity Index*. Statistische Auswertung mittels eines zweiseitigen, ungepaarten T-Tests an den einzelnen Tagen zwischen den beiden Genotypen in Abbildung A und einer two-way ANOVA mit Darstellung als Einzel- und Mittelwerte ± SEM mit *=*p*<0,05, **=*p*<0,01, ***=*p*<0,001 und ****=*p*<0,0001 zwischen den Gruppen.

Um histologische Veränderungen des Kolons festzuhalten und mögliche Unterschiede zwischen den Genotypen GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} feststellen zu können, wurde der MCHI in Anlehnung an eine etablierte Methode von Koelink et al. bestimmt. In der Annahme, dass mögliche Differenzen im akuten Krankheitsstadium am

stärksten ausgeprägt sind, betrachteten wir neben den Kontrollen lediglich die Tiere der Gruppe DSS 5+2.

Die Analyse zeigte für alle DSS-Tiere (Cre⁻: $10 \pm 0,3$ vs. $1 \pm 0,2$ P, $p < 0,0001$; Cre⁺: $11 \pm 0,2$ vs. $1 \pm 0,2$ P, $p < 0,0001$) erhöhte MCHI, was erwartungsgemäß auf einen Entzündungsprozess mit vermehrter Gewebsveränderung im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis schließen lässt (**Abb. 15**). Hierbei wiesen GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} verglichen mit GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} leicht erhöhte MCHI auf ($11 \pm 0,2$ vs. $10 \pm 0,3$ P, $p < 0,05$).

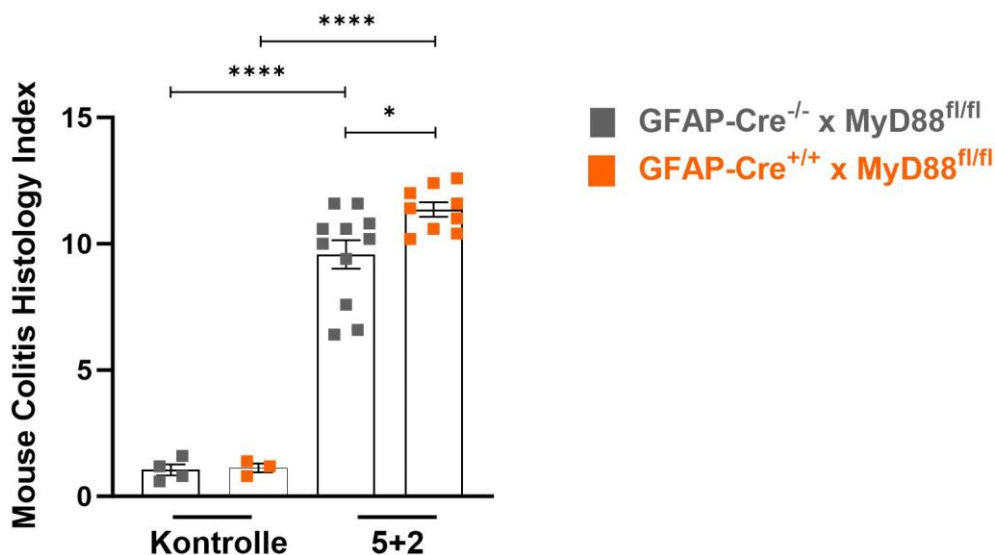


Abb. 15: *Mouse Colitis Histology Index* von GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} Mäusen. Hier dargestellt sind jeweils die Werte der Kontrollkohorten (Cre⁻: n=4, Cre⁺: n=3) und der Gruppe DSS 5+2 (Cre⁻: n=11, Cre⁺: n=9). 5+2=DSS 5+2. Statistische Auswertung mittels einer two-way ANOVA mit Darstellung als Einzel- und Mittelwerte ± SEM mit *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$ und ****= $p < 0,0001$ zwischen den Gruppen.

Wie im ersten Teil dieser Arbeit bereits demonstriert, geht eine DSS-induzierte Kolitis ähnlich wie andere enterale Entzündungsgeschehen mit einer erhöhten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine einher. Während das Kolongewebe im ersten Teil dieser Arbeit im Gesamten analysiert wurde, betrachteten wir bei Untersuchung des Einflusses der EGZ die Proteinlevel in MC und ME getrennt voneinander. Hier wurde aufgrund des begrenzten Probenmaterials lediglich die Freisetzung von IL-6 analysiert.

Die Messung der IL-6-Konzentration in der MC ergab bei den GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} Tieren für DSS 5+2 (512±75 vs. 122±8 pg/mg Protein, p<0,0001) und 5+7 DAI≥2 (299±58 vs. 122±8 pg/mg Protein, p<0,05) erhöhte Werte. Für DSS 5+7≤1 desselben Genotyps ergab sich keine signifikante Konzentrationserhöhung (p>0,9). Die DSS-Mäuse der Linie GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} wiesen nur geringfügig, nicht signifikant erhöhte IL-6-Proteinlevel auf (**Abb. 16A**).

Ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Genotypen konnte nur in der Gruppe DSS 5+2 festgestellt werden, wobei für GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} im Vergleich zu GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} höhere IL-6-Level in der MC gemessen wurden (512±75 vs. 252±45 pg/mg Protein, p<0,0001).

Wie in **Abb. 16B** dargestellt ergab die Analyse der ME lediglich für DSS 5+2 der GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} Mäuse eine signifikant gesteigerte IL-6-Konzentration (298±65 vs. 129±5 pg/mg Protein, p<0,05). Relevante Unterschiede der IL-6-Sekretion in der ME zwischen den Genotypen GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} lagen keine vor.

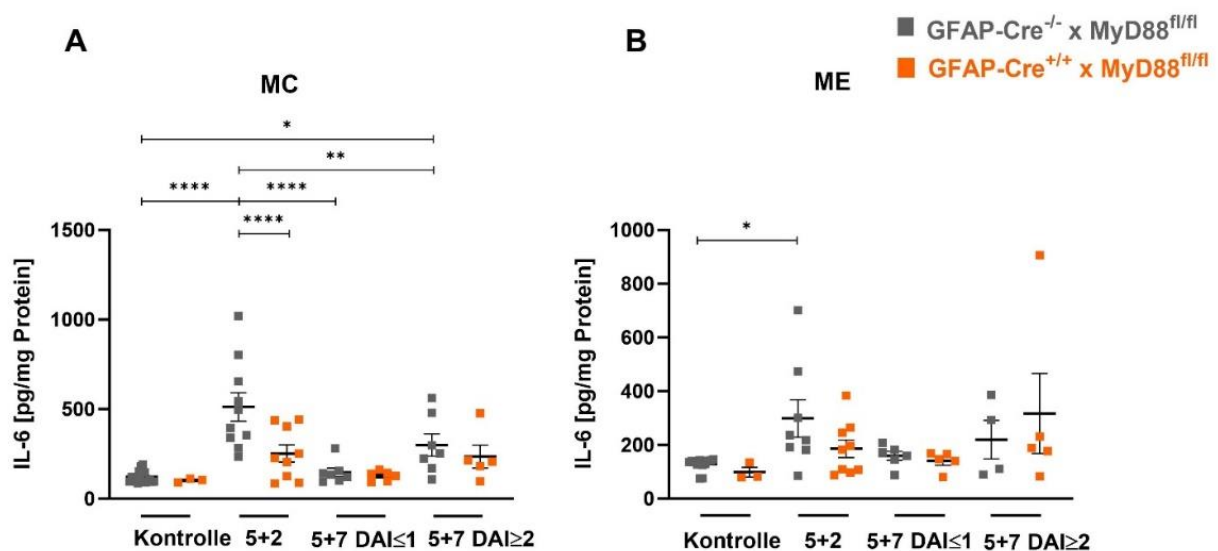


Abb. 16: IL-6-Gewebeproteinlevel in MC und ME der Tierlinien GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl}. Nach Separierung von MC und ME und jeweiliger Proteinisolierung und BCA-Messung, wurde die Gewebekonzentration von IL-6 mittels ELISA bestimmt. **(A)** IL-6-Konzentration in der MC in den Gruppen Kontrolle (Cre^{-/-}: n=19, Cre^{+/+}: n=3), DSS 5+2 (Cre^{-/-}: n=10, Cre^{+/+}: n=9), DSS 5+7 DAI≤1 (Cre^{-/-}: n=7, Cre^{+/+}: n=6) und DSS 5+7 DAI≥2 (Cre^{-/-}: n=7, Cre^{+/+}: n=5). **(B)** IL-6-Konzentration in der ME in den Gruppen Kontrolle (Cre^{-/-}: n=16, Cre^{+/+}: n=3), DSS 5+2 (Cre^{-/-}: n=8, Cre^{+/+}: n=9), DSS 5+7 DAI≤1 (Cre^{-/-}: n=6, Cre^{+/+}: n=5) und DSS 5+7 DAI≥2 (Cre^{-/-}: n=4, Cre^{+/+}: n=5). 5+2=DSS 5+2; 5+7

DAI \leq 1=DSS 5+7 DAI \leq 1; 5+7 DAI \geq 2=DSS 5+7 DAI \geq 2. DAI=*Disease Activity Index*. Statistische Auswertung mittels eines two-way ANOVA mit Darstellung als Einzel- und Mittelwerte \pm SEM mit *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001 und ****=p<0,0001 zwischen den Gruppen.

Wider Erwarten ergab die oben genannte Untersuchung zum Einfluss der EGZ auf den Verlauf einer DSS-Kolitis über TLR und andere MyD88-abhängige Rezeptoren nur geringe Differenzen zwischen den Genotypen GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl}. So zeigten GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} gegenüber GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} leicht erhöhte MCHI, wohingegen GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} im Vergleich zu GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} eine gesteigerte IL-6-Konzentration in der MC aufwiesen.

Da insbesondere der IL-1R1 in der Pathogenese des POI eine entscheidende Rolle spielt und wir bei genetischer Ablation des IL-1R1 in EGZ gemäß unserer Hypothese eine mildere Kolitis erwarteten, wendeten wir das DSS-Modell im dritten Teil dieser Arbeit bei Mäusen mit den Genotypen GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} an.

3.3 Die Untersuchung des Effektes von 3 % DSS in GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} Mäusen

Nach Etablierung des DSS-Modells und der Untersuchung des Einflusses der EGZ auf eine DSS-induzierte Kolitis via MyD88-assoziierte Rezeptoren, war der IL-1R1 für uns von besonderem Interesse. So wurde das DSS-Modell an Mäusen der Tierlinien GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} angewandt, um die Bedeutsamkeit des IL-1R1 in EGZ auf den Verlauf einer Kolitis zu eruieren. Die Untersuchungen zeigten keinerlei Diskrepanzen zwischen den Kontrollen beider Genotypen.

Bei allen DSS-Mäusen kam es zu wässriger oder blutiger Diarrhö und einem Gewichtsverlust verglichen mit dem Ausgangsgewicht an Tag 0 (**Abb. 18A**). Im Laufe der Beobachtungsperiode konnte mit Ausnahme von Versuchstag 4 zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} festgestellt werden. An Versuchstag 4 zeigten GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} einen leicht höheren Gewichtsverlust als die behandelten GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} Tiere (p<0,05). Interessanterweise erholten sich die GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} Tiere der Gruppe DSS 5+7 DAI \leq 1 von ihrem zwischenzeitlichen Gewichtsverlust so stark, dass sie am Todestag im Vergleich zum Ausgangsgewicht durchschnittlich mehr wogen.

Bei Untersuchung der Kolonlänge konnte für DSS 5+2 (Cre⁻: 74±4 vs. 100±2 %, p<0,0001; Cre⁺: 72±4 vs. 100±4 %, p<0,0001) und 5+7 DAI ≥2 (Cre⁻: 82±5 vs. 100±2 %, p<0,001; Cre⁺: 83±2 vs. 100±4 %, p<0,05) beider Genotypen eine deutliche Längenverkürzung festgestellt werden (**Abb. 18B**). Bei DSS 5+7 DAI≤1 beider Tierlinien (Cre⁻: p>0,7; Cre⁺: p>0,4) ließ sich keine Verkürzung nachweisen. In Bezug auf die Kolonlänge zeigten sich zwischen GFAP-Cre⁻ x IL-1R1^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} Mäusen keine signifikanten Unterschiede.

Im Anschluss wurden die DAIs bestimmt. Wie in **Abb. 17** und **Abb. 18C** dargestellt, wiesen alle Versuchstiere der Gruppe DSS 5+2 deutlich erhöhte DAIs auf, wobei 90 % der GFAP-Cre⁻ x IL-1R1^{fl/fl} (n=11) und 88 % der GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} (n=9) Versuchstiere schwer krank waren. Die Gruppe der DSS 5+7 Mäuse zeigte eine größere Verteilungsbreite, da die Tiere zum Zeitpunkt der DAI-Bestimmung teilweise gesund, krank und schwer krank waren. Auch hier lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen vor.

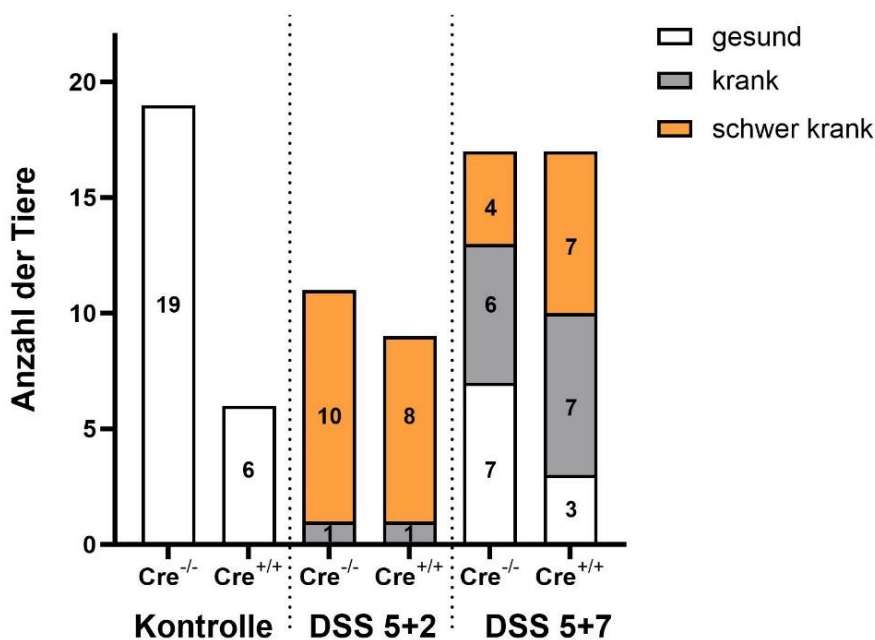


Abb. 17: Krankheitsgrade gemäß dem *Disease Activity Index* von GFAP-Cre⁻ x IL-1R1^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} Mäusen. Dargestellt ist die Anzahl der Tiere unterteilt nach Krankheitsgrad in den Gruppen Kontrolle (Cre⁻: n=19, Cre⁺: n=6), DSS 5+2 (Cre⁻: n=11, Cre⁺: n=9), DSS 5+7 (Cre⁻: n=17, Cre⁺: n=17). Dabei werden die Grade gesund (DAI=0-1), krank (DAI=2-3) und schwer krank (DAI= ≥4) unterschieden. DSS=*Dextran-Sulfat-Sodium*.

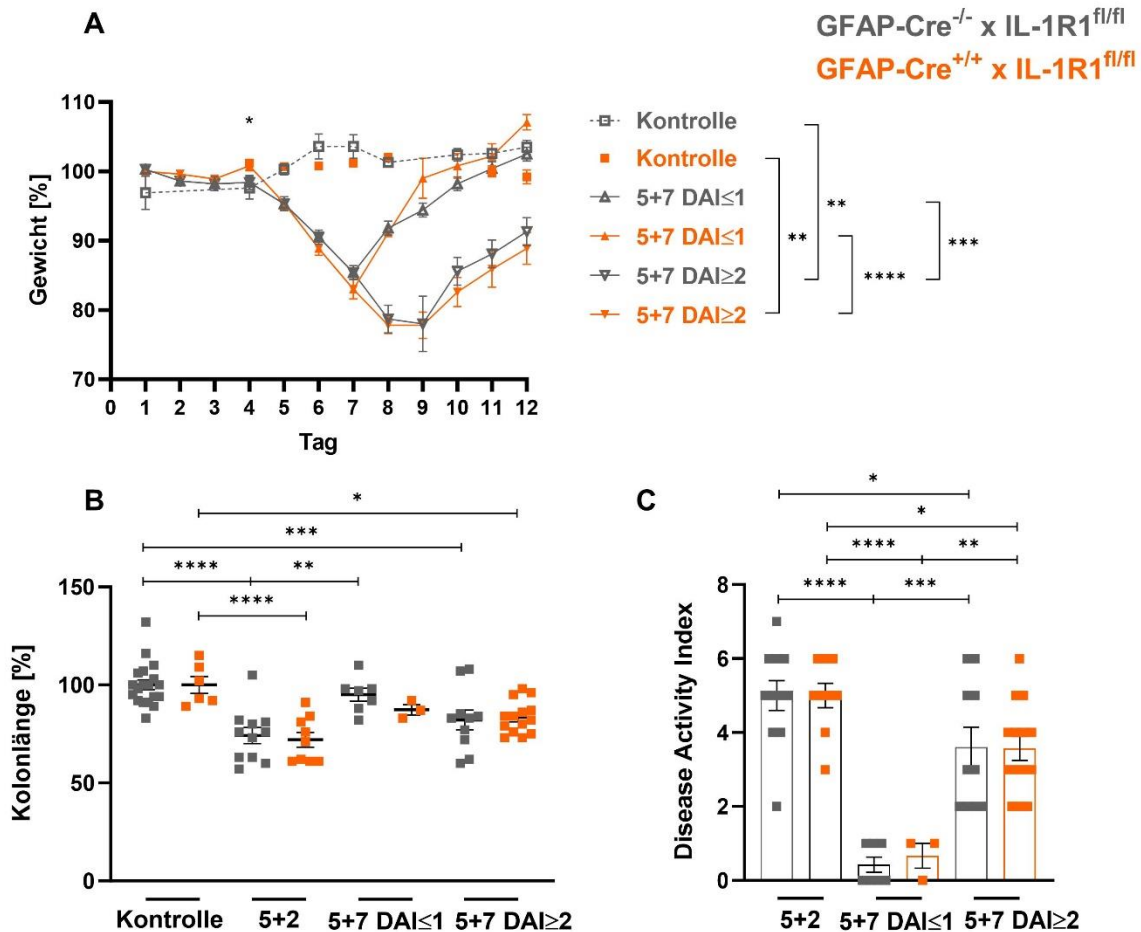


Abb. 18: Effekt von 3 % DSS auf Kolonlänge, Gewichtsveränderung und *Disease Activity Index* bei GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} Mäusen.

Die Tiere der Gruppe DSS 5+7 wurden gemäß ihrem DAI in DAI≤1 und DAI≥2 separiert.

(A) Untersuchung der Gewichtsveränderung [%] im Vergleich zum Ausgangsgewicht an Tag 0. **(B)** Darstellung der Kolonlänge in Prozent. Hier wurde jede gemessene Kolonlänge mit dem Mittelwert der gleichgeschlechtlichen Kontrollen ins Verhältnis gesetzt. **(C)** DAI-Werte in den Gruppen. Dargestellt sind jeweils die Gruppen Kontrolle (Cre^{-/-}: n=19, Cre^{+/+}: n=6), DSS 5+2 (Cre^{-/-}: n=11, Cre^{+/+}: n=9), DSS 5+7 DAI≤1 (Cre^{-/-}: n=7, Cre^{+/+}: n=3) und DSS 5+7 DAI≥2 (Cre^{-/-}: n=10, Cre^{+/+}: n=14). 5+2=DSS 5+2; 5+7 DAI≤1=DSS 5+7 DAI≤1; 5+7 DAI≥2=DSS 5+7 DAI≥2. DAI=*Disease Activity Index*. Statistische Auswertung mittels eines zweiseitigen, ungepaarten T-Tests an den einzelnen Tagen zwischen den beiden Genotypen in Abbildung A und einer two-way ANOVA mit Darstellung als Einzel- und Mittelwerte ± SEM mit *=*p*<0,05, **=*p*<0,01, ***=*p*<0,001 und ****=*p*<0,0001 zwischen den Gruppen

Die im Rahmen einer DSS-induzierten Kolitis vorkommenden histologischen Veränderungen wurden mithilfe des MCHI analysiert. Dabei betrachteten wir die Kontrollen und die Tiere der Gruppe DSS 5+2 beider Genotypen (**Abb. 19**). Die Analyse ergab für alle mit DSS-behandelten Versuchstiere signifikant erhöhte Werte verglichen mit den jeweiligen Kontrollen (Cre⁻: 11±0,2 vs. 1±0,2 P, p<0,0001; Cre⁺: 11±0,3 vs. 1±0,2 P, p<0,0001). Dies deutet auf ein Entzündungsgeschehen hin. Differenzen zwischen den Tierlinien GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} konnten dabei nicht festgestellt werden (p>0,3).

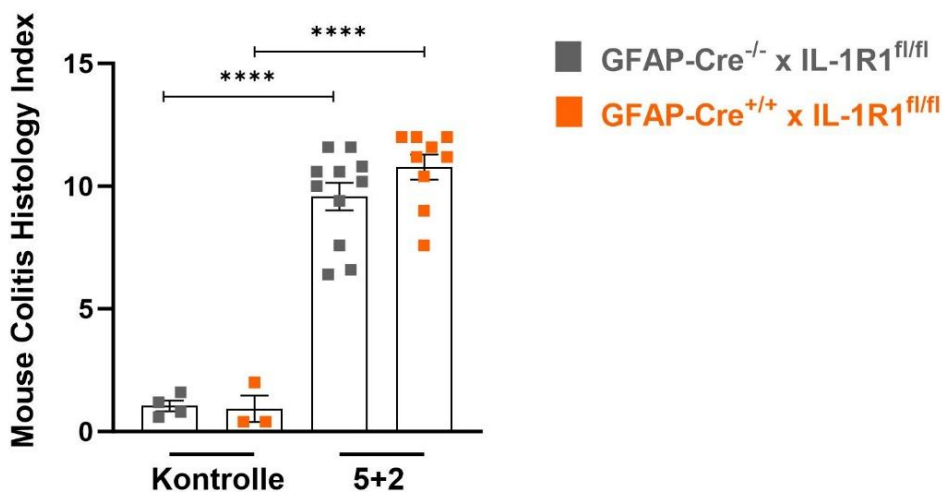


Abb. 19: Mouse Colitis Histology Index von GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} Mäusen. Dargestellt sind jeweils die Werte der Kontrollkohorte (Cre⁻: n=4, Cre⁺: n=3) und der Gruppe DSS 5+2 (Cre⁻: n=11, Cre⁺: n=9). 5+2=DSS 5+2. Statistische Auswertung mittels einer two-way ANOVA mit Darstellung als einzelne Werte mit Mittelwert ± SEM mit * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001 und **** = p<0,0001 zwischen den Gruppen.

Um die durch die Entzündung bedingte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 im Gewebe zu untersuchen, wurden die IL-6-Konzentrationen per ELISA ermittelt. Auch hier wurden MC und ME separiert betrachtet und die Gewebeproteine nach deren Isolation der Analyse zugeführt. Wie in **Abb. 20** dargestellt, zeigten sowohl GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} als auch GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} Tiere der Gruppe DSS 5+2 erhöhte IL-6-Level in MC (Cre⁻: 512±75 vs. 122±8 pg/mg Protein, p<0,0001; Cre⁺: 841±146 vs. 172±9 pg/mg Protein, p<0,0001) und ME (Cre⁻: 298±65 vs. 129±5 pg/mg Protein, p<0,01; Cre⁺: 630±67 vs. 183±26 pg/mg Protein, p<0,0001) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen.

Dabei lagen die IL-6-Konzentrationen der GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} signifikant höher als die der GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} Tiere (MC: 841±146 vs. 512±75 pg/mg Protein, p<0,001; ME: 630±67 vs. 298±65 pg/mg Protein, p<0,0001).

Bei den übrigen DSS-Mäusen konnte im Vergleich zu den Kontrollen keine gesteigerte IL-6-Freisetzung in der MC und der ME gemessen werden. Es ließen sich keine weiteren Differenzen zwischen den beiden Genotypen feststellen.

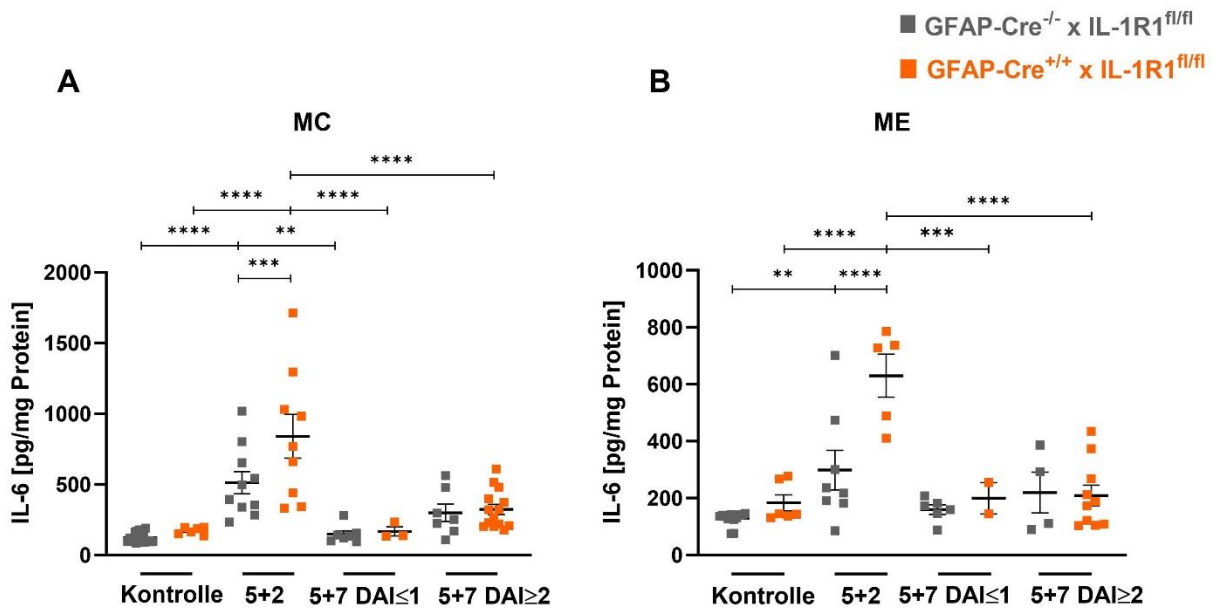


Abb. 20: IL-6-Gewebeproteinlevel in MC und ME der Tierlinien GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl}. Nach Separierung von MC und ME und jeweiliger Proteinisolierung und BCA-Messung, wurde die Gewebekonzentration von IL-6 mittels ELISA bestimmt. **(A)** IL-6-Konzentration in der MC in den Gruppen Kontrolle (Cre⁻: n=19, Cre⁺: n=6), DSS 5+2 (Cre⁻: n=10, Cre⁺: n=9), DSS 5+7 DAI≤1 (Cre⁻: n=7, Cre⁺: n=3) und DSS 5+7 DAI≥2 (Cre⁻: n=7, Cre⁺: n=14). **(B)** IL-6-Konzentration in der ME in den Gruppen Kontrolle (Cre⁻: n=16, Cre⁺: n=6), DSS 5+2 (Cre⁻: n=8, Cre⁺: n=5), DSS 5+7 DAI≤1 (Cre⁻: n=6, Cre⁺: n=2) und DSS 5+7 DAI≥2 (Cre⁻: n=4, Cre⁺: n=10). 5+2=DSS 5+2; 5+7 DAI≤1=DSS 5+7 DAI≤1; 5+7 DAI≥2=DSS 5+7 DAI≥2. DAI=Disease Activity Index. Statistische Auswertung mittels einer two-way ANOVA mit Darstellung als einzelne Werte und Mittelwert ± SEM mit * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001 und **** = p<0,0001 zwischen den Gruppen.

Entgegen der Hypothese zeigten unsere Untersuchungen zum Verlauf einer DSS-induzierten Kolitis in Mäusen der Tierlinien GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} kaum Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Lediglich die Analyse der IL-

6-Konzentration der Gruppe DSS 5+2 ergab einen signifikanten Unterschied. Hier detektierten wir bei GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} signifikant höhere Gewebeproteinlevel in MC und ME. In Bezug auf Gewichtsveränderung, Kolonlänge, DAI und MCHI ergaben sich jedoch keine relevanten Unterschiede.

4. Diskussion

Zur Untersuchung des Einflusses der aktivierten EGZ auf gastrointestinales Entzündungsgeschehen im Dickdarm, wurde zunächst mithilfe von DSS eine Kolitis induziert (Chassaing et al. 2014). Das DSS-Modell wurde in der Folge an Wildtyp-Mäusen zur Etablierung von Vergleichsparametern angewandt, um anschließend die Krankheitsverläufe der Tiere aus den Linien GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} bzw. GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} mit GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} miteinander zu vergleichen.

4.1 Die Etablierung des DSS-Modells in Wildtyp-Mäusen

Wie erwartet wiesen alle Mäuse, die DSS im Trinkwasser erhielten, im Laufe des Versuchs einen Gewichtsverlust auf. Dabei zeigte sich, dass ein Teil der DSS 5+7 Gruppe, im Folgenden DAI \leq 1 genannt, ab Versuchstag 8 rasch wieder an Gewicht zunahm und sich von der Kolitis erholte, während der andere Teil, im Folgenden DAI \geq 2 genannt, deutlich langsamer an Gewicht zulegte. Eine ähnliche Unterteilung zeigte sich bei Messung der Kolonlänge, wo bei DSS 5+2 und 5+7 DAI \geq 2 eine signifikante Kolonverkürzung auffiel verglichen mit 5+7 DAI \leq 1 und unbehandelten Mäusen. Bei den Tieren der Gruppe DSS 5+7 DAI \leq 1 scheint es somit, nach zwischenzeitlich bestehender Kolitis mit Diarrhö und Gewichtsverlust, zu einer Regeneration gekommen zu sein. Beim Betrachten der DAI wiesen alle Tiere der Gruppe DSS 5+2 sowie ein Teil der 5+7 Krankheitsgrade der Kategorien „krank“ oder „schwer krank“ auf, während der zweite Teil der Gruppe DSS 5+7 mit einem DAI \leq 1 als „genesen“ oder „gesund“ eingeordnet wurde. Wie in zahlreichen Studien beschrieben, geht auch die DSS-induzierte Kolitis ähnlich wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen mit histopathologischen Veränderungen einher (Melgar et al. 2005; Perše und Cerar 2012; Yesi et al. 2020). Der von uns verwendete MCHI wurde bei kranken und schwer kranken Tieren (DAI \geq 2) sowie der Kontrollkohorte erhoben. Erwartungsgemäß beobachteten wir bei DSS 5+2 und 5+7 DAI \geq 2 signifikant erhöhte Werte. Darüber hinaus zeigte sich eine signifikante Korrelation von MCHI und DAI. Bei DSS-induzierter Kolitis kommt es zu einer gesteigerten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Chassaing et al. 2014). Auch hier konnten wir bei DSS 5+2 und 5+7 DAI \geq 2 signifikant erhöhte IL-6-Gewebeproteinlevel messen. Für

DSS 5+7 DAI \leq 1 wurde nur eine leichte Konzentrationserhöhung festgestellt. Interessanterweise wiesen alle DSS-Mäuse erhöhte TNF- α -Konzentrationen auf, wobei bei DSS 5+2 im Vergleich zu 5+7 geringere Level vorlagen.

TNF- α wird hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von Zellen wie Lymphozyten, Fibroblasten, Mast- und Endothelzellen synthetisiert. In seiner Funktion als proinflammatorisches Zytokin ist er maßgeblich in immunologische Prozesse wie Zelldifferenzierung, Apoptose, Zellteilung und Zytokinsekretion involviert (Jang et al. 2021; Parameswaran und Patial 2010; Rahman und McFadden 2006; Vassalli 1992).

Bei Patienten mit CED sind die Konzentrationen von IL-6 und TNF- α erhöht. Dabei scheinen insbesondere die IL-6-Level mit Krankheitsaktivität, endoskopischen und histopathologischen Veränderungen zu korrelieren (Atreya und Neurath 2008; Fonseca-Camarillo et al. 2009; McCormack et al. 2001; Shahini und Shahini 2023; Reimund et al. 1996; Xiao et al. 2016; Yamamoto et al. 2000). Mitselou et al. analysierten nach immunohistochemischer Färbung die Intensitäten von IL-6, IL-1 β und TNF- α in Gewebeproben bei Patienten mit CED und Reizdarmsyndrom. Dabei zeigten sich bei Patienten mit CED deutlich höhere Werte von IL-6 als von TNF- α und IL-1 β (Mitselou et al. 2020).

In den nachfolgenden Analysen beschränkten wir uns in Anbetracht des geringen Probenmaterials nach der Separation in MC und ME auf die Gewebekonzentrationen von IL-6.

EGZ spielen eine wesentliche Rolle in inflammatorischen Prozessen. So können sie beispielsweise proinflammatorische Zytokine synthetisieren, Immunzellen stimulieren und S100-b/RAGE-vermittelt eine Immunreaktion auslösen (Cirillo et al. 2011; Schneider et al. 2021; Stoffels et al. 2014; Turco et al. 2014). In der Literatur wird die Reaktion der EGZ bei Inflammation auch als sogenannte *enteric gliosis* bezeichnet. Hierbei kommt es unter anderem zu einer gesteigerten Aktivität mit erhöhter GFAP- und S100-b-Synthese und morphologischer Veränderung (Schneider et al. 2021; Seguella und Gulbransen 2021). Da es zudem zu einer erhöhten Proliferation kommt, analysierten wir diese mittels Immunfluoreszenzfärbung des Proliferationsmarkers Ki-67 in Muskularispräparaten (Stakenborg et al. 2022). Dabei diente die Färbung MHC-II positiver Zellen als Indikator für Entzündungsreaktion und Infiltration von Immunzellen. Sowohl bei DSS 5+2 als auch 5+7 DAI \geq 2 zeigte sich eine signifikant gesteigerte Proliferation von EGZ im Vergleich zu

den unbehandelten Mäusen. Für DSS 5+7 $DAI \leq 1$ hingegen konnten keine erhöhten Werte erhoben werden. Darüber hinaus ließ sich mittels Korrelationsanalyse ein signifikanter Zusammenhang zwischen DAI und Proliferation der EGZ feststellen ($p < 0,0001$), sodass die Aktivität der EGZ auch Aufschluss über den Krankheitsgrad zu geben scheint. Für die Untersuchung der transgenen Mäuse haben wir folgende etablierte Parameter genutzt: Gewichtsveränderung, Kolonlänge, DAI, MCHI und IL-6-Konzentration in MC und ME.

4.2 Die Rolle der EGZ im Krankheitsverlauf bei DSS-Kolitis

EGZ sind vielseitig in Entzündungsgeschehen involviert. Sie können beispielsweise Immunzellen wie Makrophagen rekrutieren und aktivieren, über ihren Aktivierungsmarker S100-b einen Immunstimulus auslösen, Antigene über MHC-II präsentieren und NO, proinflammatorische Zytokine und Chemokine synthetisieren (Chow et al. 2021; Cirillo et al. 2011; Schneider et al. 2022; Stakenborg et al. 2022; Stoffels et al. 2014; Turco et al. 2014). Insbesondere wurde bisher ihr Einfluss in der Pathogenese des POI untersucht. So postulierten Schneider et al., dass es bei Mäusen ohne IL-1R1 in EGZ nach intestinaler Manipulation zu weniger Inflammation und Krankheitsfällen kam (Schneider et al. 2022). Darüber hinaus zeigten *in vitro* Versuche, dass EGZ nach IL-1 β -Stimulation IL-6 freisetzen (Stoffels et al. 2014). In Anlehnung daran, untersuchten wir den Einfluss von EGZ über den IL-1 Signalweg und MyD88-abhängige Signalwege auf eine DSS-induzierte Entzündung im Dickdarm.

Bei Vergleich einer DSS-Kolitis in Mäusen der Tierlinien GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} zeigten alle DSS-Mäuse Zeichen einer Kolitis im Sinne von Gewichtsverlust und Kolonverkürzung. Zwischen den beiden Genotypen ließ sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied darstellen. Die histologische Analyse der Gruppe DSS 5+2 hingegen ergab bei GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} Tieren signifikant höhere MCHI, was für einen größeren histologischen Schaden spricht.

In Anlehnung an die Forschungsarbeiten von Rakoff-Nahoum et al. ist dies möglicherweise durch den Wegfall protektiver Einflüsse der EGZ nach MyD88-abhängiger Rezeptorstimulation zu begründen. So zeigten dort die Versuchstiere ohne das Adapterprotein vermehrt fulminante Verläufe und Versterben bei DSS-Kolitis (Rakoff-

Nahoum et al. 2004). Diesen Versuchstieren fehlte jedoch in allen Zellen das Adapterprotein MyD88.

Daneben beschrieben Shi et al. einen TLR4-vermittelten, epithelialen Regenerationsprozess bei DSS-induzierter Kolitis und stellten bei TLR4-Knockout Mäusen eine erhöhte Anfälligkeit für DSS fest. Da EGZ ebenfalls TLR4 exprimieren und bei DSS-Kolitis eine hochregulierte TLR4-Expression aufweisen, könnte der Wegfalls des TLR4/MyD88 Signalwegs in den von uns betrachteten GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} Mäusen für die erhöhten MCHI verantwortlich sein (Shi et al. 2019).

Im Gegensatz dazu ergaben unsere Untersuchung zur Freisetzung von IL-6 in der MC für DSS 5+2 der Tierlinie GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} signifikant höhere Konzentrationen im Vergleich mit GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} Mäusen.

Bei Analyse der ME ließ sich für DSS 5+2 der GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} Mäuse eine gesteigerte IL-6-Sekretion nachweisen. Es zeigte sich jedoch keine relevante Differenz zwischen den beiden Genotypen.

Der Unterschied von MC und ME könnte dadurch begründet sein, dass eine DSS-Kolitis ähnlich wie die Colitis ulcerosa primär in der Tunica mucosa eine Inflammation auslöst (Chassaing et al. 2014; Collins und Rhodes 2006; Melgar et al. 2005). Erhöhte Zytokinkonzentrationen in der ME könnten daher ein Zeichen besonders ausgeprägter Inflammation sein, sodass hier die Analyse von MC und ME auf einen milderen Krankheitsverlauf der Mäuse mit dem Genotyp GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} hindeuten könnte. Auch die Untersuchung der Tierlinien GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} zeigte bei allen DSS-Tieren eine Kolitis mit Gewichtsverlust, Kolonverkürzung und DAI-Verteilungsmuster ähnlich den Wildtypen aus dem ersten Teil dieser Arbeit. Sowohl GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} als auch GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} der Gruppe DSS 5+2 wiesen histopathologische Veränderungen mit erhöhten MCHI auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen lag nicht vor. Bei Analyse der IL-6-Freisetzung in MC und ME zeigten beide Tierlinien der Gruppe DSS 5+2 eine gesteigerte Sekretion, wobei bei GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} signifikant höhere Level gemessen wurden. Dies hebt sich von den GFAP-Cre^{+/+} x Myd88^{fl/fl} Tieren aus dem zweiten Teil dieser Arbeit ab, da hier die transgenen Mäuse niedrigere Werte aufwiesen.

Für die Gruppe DSS 5+7 beider Genotypen ergab die Analyse der MC lediglich bei DSS 5+7 $DAI \geq 2$ der GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} Tiere eine signifikant erhöhte IL-6-Konzentration. Unterschiede zwischen den beiden Tierlinien ließen sich hier nicht nachweisen.

Siegmund et al. beschrieben bei Mäusen mit funktionsunfähigem ICE und somit biologisch unwirksamem IL-1 β , mildere Krankheitsverläufe einer DSS-Kolitis verglichen mit Wildtyp-Mäusen (Siegmund et al. 2001). Daneben demonstrierten Stoffels et al. in Zellkulturversuchen, dass EGZ auf IL-1 β -Stimulation mit IL-6-Freisetzung reagieren (Stoffels et al. 2014). In Anbetracht dieser Forschungsarbeiten, ist ein Einfluss der EGZ auf den Verlauf einer DSS-Kolitis durch fehlende IL-6-Sekretion bei Ablation des IL-1 Signalwegs denkbar.

Diese These ließ sich mittels unserer Analysen jedoch nicht weiterverfolgen, da Mäuse der Linie GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} im Vergleich zu den funktionellen Wildtypen sogar erhöhte statt erniedrigter IL-6-Gewebeproteinlevel in MC und ME aufwiesen. Hier kommen andere IL-6 sezernierende Zellen als Ursache der erhöhten IL-6-Konzentration in Betracht. Neben EGZ sind vor allem T- und B-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten eine Quelle für IL-6 (Tanaka et al. 2014). Makrophagen werden durch EGZ über S100-b und den Monozytenkolonien-stimulierenden Faktor (M-CSF) aktiviert und rekrutiert (Grubišić et al. 2020; Schneider et al. 2021). Da in der Literatur sowohl bei DSS-induzierter Kolitis als auch bei CED eine gesteigerte S100-b-Expression von EGZ beschrieben ist, könnten EGZ auch indirekt für die IL-6-Produktion verantwortlich sein (Esposito et al. 2014; Seguella und Gulbransen 2021; Cirillo et al. 2009).

Es wäre ebenfalls plausibel, dass EGZ nach Stimulation anderer MyD88-assoziiierter Rezeptoren, wie beispielsweise dem TLR4, zur IL-6-Freisetzung angeregt werden und somit trotz Ablation des IL-1R1 IL-6 freisetzen.

Der TLR4 spielt eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von Entzündungsprozessen. So vermittelt dieser MyD88-abhängig die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6 und MyD88-unabhängig die Synthese von Interferonen (Lucas und Maes 2013). *In vivo* Studien von Kovler et al. zum TLR4-Signalweg bei nekrotisierender Enterokolitis (NEC) zeigten, dass Mäuse ohne TLR4-Expression in EGZ vor einer NEC geschützt waren. Zudem scheint der von EGZ synthetisierte *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) einen protektiven Effekt zu haben. So fand die Forschungsgruppe bei Patienten und Mäusen mit NEC eine erniedrigte EGZ-Anzahl und verminderte BDNF-

Level (Kovler et al. 2021). Daneben beobachteten Esposito et al. eine gesteigerte TLR4-Synthese in EGZ bei mit DSS-behandelten Tieren, sodass ein TLR4-gekoppelter Einfluss von EGZ auf intestinale Entzündungsgeschehen denkbar ist (Esposito et al. 2014). EGZ exprimieren neben dem TLR4 auch den TLR5. Enderes et al. postulieren, dass die Mikrobiom-abhängige Entwicklung der EGZ in der Lamina mucosa über den MyD88-Signalweg reguliert wird. Laut deren Studien könnten dabei die MyD88-assoziierten Rezeptoren TLR5 und IL-1R1 eine wesentliche Rolle spielen (Enderes et al. 2023). Zudem zeigten Kabouridis et al. in *in vivo* Versuchen mit *germ-free* Mäusen, dass EGZ erst postnatal in die Lamina mucosa einwandern und neben der Entwicklung auch die Homöostase der EGZ vom Mikrobiom abhängig ist (Kabouridis et al. 2015).

Insgesamt suggerieren unsere Ergebnisse, dass EGZ weniger über den IL-1R1 als über andere MyD88-assoziierte Rezeptoren wie möglicherweise den TLR4 Einfluss auf den Verlauf einer DSS-induzierten Kolitis nehmen. Die Resultate der IL-6 ELISA deuten wider Erwarten bei GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} auf schwerere Krankheitsverläufe im Sinne gesteigerter IL-6-Level hin.

Dies könnte durch eine fehlende, zusätzlich inhibierende Wirkung des IL-1R1 auf die allgemeine IL-6-Synthese bedingt sein. In den von uns erhobenen Daten findet sich jedoch kein weiterer Hinweis auf einen Unterschied im Krankheitsverlauf der Tierlinien GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl}. Somit konnte die These, dass es sich bei dem IL-1R1 um einen wichtigen Rezeptor für den Einfluss der EGZ auf die Pathogenese und Aggravation inflammatorischer Prozesse im Dickdarm handelt, anhand unserer Untersuchungen nicht belegt werden. Eine entscheidende Teilhabe der EGZ in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen über den TLR4 oder andere MyD88-abhängige Rezeptoren erscheint denkbar.

4.3 Limitationen der Arbeit

Zu den Einschränkungen dieser Arbeit zählt, dass eine DSS-Kolitis von Tier zu Tier variieren kann, wobei Stressoren wie das tägliche Wiegen, wechselndes Laborpersonal, Geräusche oder andere Mäuse mit teils dominanten Charakterzügen neben einer unterschiedlichen Anfälligkeit für DSS Einfluss auf den Verlauf einer DSS-Kolitis nehmen können. Alter, Geschlecht und Ausgangsgewicht der Tiere sind weitere Einflussfaktoren (Chassaing et al. 2014; Egger et al. 2000).

Das Ergebnis der histologischen Analyse hängt von der Schnitthöhe bei Organentnahme ab, da eine DSS-Kolitis ähnlich wie Colitis ulcerosa vor allem aboral mit histopathologischen Veränderungen imponiert. Zwar wurde stets das aboralste Segment des Kolons nach Darlegung des Gastrointestinaltraktes zur histologischen Aufarbeitung verwendet, eine Varianz ist jedoch nicht auszuschließen.

Für zukünftige Forschungsarbeiten wäre eine zusätzliche Western Blot Analyse von IL-6 und ergänzend S100-b als glialer Aktivitätsparameter zur Überprüfung der hier präsentierten Ergebnisse von Interesse. Auch könnte in folgenden DSS-Versuchen das fäkale Lipocalin-2 als möglicher objektiver, nicht-invasiver Parameter hinzugezogen werden, um den Verlauf einer DSS-Kolitis einzuschätzen (Chassaing et al. 2012).

Auch die Untersuchung der Proliferation der EGZ in genetisch-modifizierten Mäusen mittels immunhistochemischer Färbung von Muskularispräparaten könnte von Bedeutung sein. Diese wurde von uns aufgrund der geringen Menge an Probenmaterial nicht durchgeführt.

5. Zusammenfassung

Colitis ulcerosa und Morbus Crohn gehören zu den häufigsten chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, mit (weiter) steigenden Inzidenzen.

Vorausgegangene Arbeiten unserer Forschungsgruppe legen einen Einfluss von enterischen Gliazellen (EGZ) auf die Genese und Aggravation gastrointestinaler Entzündungen wie beispielsweise dem postoperativen Ileus nahe, weshalb EGZ als möglicher Ansatzpunkt für zukünftige Therapien angesehen werden. *In vitro* und *in vivo* Versuche demonstrierten, dass EGZ bei Inflammation vermehrt den Toll-like Rezeptor Typ 4, den Interleukin-1 Rezeptor 1 (IL-1R1) und das Glia-spezifische Calcium/Zink-bindende Protein S100-beta exprimieren. Auf Stimulation des IL-1R1 reagieren sie mit Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie beispielsweise Interleukin-6. Des Weiteren besitzen EGZ die Fähigkeit über S100-beta einen Immunstimulus auszulösen und sich an Entzündungsreaktionen im Darm zu beteiligen.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des selektiven Einflusses *Myeloid differentiation primary response protein 88*-(MyD88)-assoziierter Rezeptoren besonders des IL-1R1 in EGZ auf eine Entzündung im Kolon. Hierzu induzierten wir in Wildtyp-Mäusen sowie den beiden transgenen Tierlinien GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} mittels oraler Applikation von *Dextran-Sulfat-Natrium* eine Kolitis. Anschließend untersuchten wir die Unterschiede im Krankheitsverlauf durch Analyse von Gewicht, Kolonlänge, *Disease Activity Index*, histologischen Veränderungen und der Gewebekonzentrationen der Zytokine Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor-alpha.

Entgegen des bekannten Einflusses EGZ-spezifischer IL-1R1 Signalwege in der Pathogenese des postoperativen Ileus, fanden wir im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis keinen Unterschied zwischen Mäusen mit IL-1R1 defizienten und IL-1R1 kompetenten EGZ in Bezug auf den Schweregrad der Kolitis. In Tieren mit einer EGZ-spezifischen MyD88-Defizienz konnten hingegen diskrete, jedoch für den klinischen Zustand und *Disease Activity Index* nicht weiter bedeutende Unterschiede zwischen GFAP-Cre^{-/-} x MyD88^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x MyD88^{fl/fl} Mäusen festgestellt werden. Ein Zusammenhang zwischen Entzündungen im Dickdarm und dem IL-1R1 oder anderen MyD88-abhängigen Rezeptoren in EGZ ließ sich anhand unserer Daten somit nicht nachweisen. Die MyD88 und IL-1R1 vermittelten Signalwege scheinen daher krankheitsspezifische,

immunmodulieren Funktionen auszuüben, die im Modell der akuten Kolitis keine Rolle spielen. Inwiefern dies auch für chronische Kolutismodelle gilt, bleibt unklar und sollte Ziel weiterführender Studien sein.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Lokalisation der enterischen Gliazellen in der Darmwand.	17
Abb. 2:	Überblick über die Funktionen der enterischen Gliazellen.	19
Abb. 3:	Schematische Darstellung des MyD88-abhängigen Signalweges.	21
Abb. 4:	Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.	28
Abb. 5:	Darstellung des Magendarmtraktes der Maus.	30
Abb. 6:	<i>Mouse Colitis Histology Index</i> (MCHI, Histologischer Index).	32
Abb. 7:	Darstellung des Kolons auf einer Maßplatte zur Längenbestimmung in cm.	38
Abb. 8:	Krankheitsgrade gemäß dem <i>Disease Activity Index</i> bei Wildtyp-Mäusen.	39
Abb. 9:	Effekt von 3 % DSS auf Kolonlänge, Gewicht und <i>Disease Activity Index</i> bei Wildtyp-Mäusen.	40
Abb. 10:	<i>Mouse Colitis Histology Index</i> nach 3 % DSS bei Wildtyp-Mäusen.	41
Abb. 11:	Effekt von 3 % DSS auf die Proliferation der enterischen Gliazellen in der Tunica muscularis externa bei Wildtyp-Mäusen.	43
Abb. 12:	Gewebeproteinlevel von IL-6 und TNF- α nach 3 % DSS bei Wildtyp-Mäusen.	44
Abb. 13:	Krankheitsgrade gemäß dem <i>Disease Activity Index</i> von GFAP-Cre ^{-/-} x MyD88 ^{fl/fl} und GFAP-Cre ^{+/+} x MyD88 ^{fl/fl} Mäusen.	47
Abb. 14:	Effekt von 3 % DSS auf Kolonlänge, Gewichtsveränderung und <i>Disease Activity Index</i> in GFAP-Cre ^{-/-} x MyD88 ^{fl/fl} und GFAP-Cre ^{+/+} x MyD88 ^{fl/fl} Mäusen.	48
Abb. 15:	<i>Mouse Colitis Histology Index</i> von GFAP-Cre ^{-/-} x MyD88 ^{fl/fl} und GFAP-Cre ^{+/+} x MyD88 ^{fl/fl} Mäusen.	49
Abb. 16:	IL-6-Gewebeproteinlevel in MC und ME der Tierlinien GFAP-Cre ^{-/-} x MyD88 ^{fl/fl} und GFAP-Cre ^{+/+} x MyD88 ^{fl/fl} .	50
Abb. 17:	Krankheitsgrad gemäß dem <i>Disease Activity Index</i> von GFAP-Cre ^{-/-} x IL-1R1 ^{fl/fl} und GFAP-Cre ^{+/+} x IL-1R1 ^{fl/fl} Mäusen.	52

- Abb. 18:** Effekt von 3 % DSS auf Kolonlänge, Gewichtsveränderung und *Disease Activity Index* bei GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} Mäusen. 53
- Abb. 19:** *Mouse Colitis Histology Index* von GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl} Mäusen. 54
- Abb. 20:** IL-6-Gewebeproteinlevel in MC und ME der Tierlinien GFAP-Cre^{-/-} x IL-1R1^{fl/fl} und GFAP-Cre^{+/+} x IL-1R1^{fl/fl}. 55

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	<i>Disease Activity Index</i> (DAI, Krankheitsaktivitätsindex).	31
Tab. 2:	Verwendete primäre (A) und sekundäre (B) Antikörper.	34

8. Literaturverzeichnis

Adachi, O.; Kawai, T.; Takeda, K.; Matsumoto, M.; Tsutsui, H.; Sakagami, M. et al. (1998): Targeted Disruption of the MyD88 Gene Results in Loss of IL-1- and IL-18-Mediated Function. In: *Immunity* 9 (1), S. 143–150. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80596-8.

Akira, S.; Takeda, K. (2004): Toll-like receptor signalling. In: *Nature reviews Immunology* 4 (7), S. 499–511. DOI: 10.1038/nri1391.

Aksentijevich, I.; Masters, S. L.; Ferguson, P. J.; Dancey, P.; Frenkel, J.; van Royen-Kerkhoff, A. et al. (2009): An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist. In: *The New England journal of medicine* 360 (23), S. 2426–2437. DOI: 10.1056/NEJMoa0807865.

Ananthkrishnan, A. N.; Higuchi, L. M.; Huang, E. S.; Khalili, H.; Richter, J. M.; Fuchs, C. S.; Chan, A. T. (2012): Aspirin, Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use, and Risk for Crohn Disease Ulcerative Colitis: A Cohort Study. In: *Annals of Internal Medicine* 156 (5), S. 350–359. DOI: 10.1059/0003-4819-156-5-201203060-00007.

Annese, V.; Daperno, M.; Rutter, M. D.; Amiot, A.; Bossuyt, P.; East, J. et al. (2013): European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. In: *Journal of Crohn's & colitis* 7 (12), S. 982–1018. DOI: 10.1016/j.crohns.2013.09.016.

Atreya, R.; Neurath, M. F. (2008): New therapeutic strategies for treatment of inflammatory bowel disease. In: *Mucosal immunology* 1 (3), S. 175–182. DOI: 10.1038/mi.2008.7.

Baumgart, D. C. (2009): The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. In: *Deutsches Arzteblatt international* 106 (8), S. 123–133. DOI: 10.3238/arztebl.2009.0123.

Beaugerie, L.; Itzkowitz, S. H. (2015): Cancers complicating inflammatory bowel disease. In: *The New England journal of medicine* 372 (15), S. 1441–1452. DOI: 10.1056/NEJMra1403718.

- Boesmans, W.; Lasrado, R.; Vanden Berghe, P.; Pachnis, V. (2015): Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. In: *Glia* 63 (2), S. 229–241. DOI: 10.1002/glia.22746.
- Boraschi, D.; Tagliabue, A. (2013): The interleukin-1 receptor family. In: *Seminars in immunology* 25 (6), S. 394–407. DOI: 10.1016/j.smim.2013.10.023.
- Boyen, G. B. T. von; Schulte, N.; Pflüger, C.; Spaniol, U.; Hartmann, C.; Steinkamp, M. (2011): Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. In: *BMC Gastroenterology* 11, S. 3. DOI: 10.1186/1471-230X-11-3.
- Burger, D.; Dayer, J.-M.; Palmer, G.; Gabay, C. (2006): Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis? In: *Best practice & research. Clinical rheumatology* 20 (5), S. 879–896. DOI: 10.1016/j.berh.2006.06.004.
- Burns, K.; Martinon, F.; Esslinger, C.; Pahl, H.; Schneider, P.; Bodmer, J. L. et al. (1998): MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (20), S. 12203–12209. DOI: 10.1074/jbc.273.20.12203.
- Casadio, R.; Frigimelica, E.; Bossù, P.; Neumann, D.; Martin, M. U.; Tagliabue, A.; Boraschi, D. (2001): Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1 β /IL-1R I complex. In: *FEBS Letters* 499 (1-2), S. 65–68. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)02515-7.
- Cavalli, G.; Dinarello, C. A. (2015): Treating rheumatological diseases and co-morbidities with interleukin-1 blocking therapies. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 54 (12), S. 2134–2144. DOI: 10.1093/rheumatology/kev269.
- Chassaing, B.; Aitken, J. D.; Malleshappa, M.; Vijay-Kumar, M. (2014): Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. In: *Current protocols in immunology* 104, Unit 15.25.
- Chassaing, B.; Srinivasan, G.; Delgado, M. A.; Young, A. N.; Gewirtz, A. T.; Vijay-Kumar, M. (2012): Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. In: *PloS one* 7 (9), e44328. DOI: 10.1371/journal.pone.0044328.

Cheifetz, A. S. (2013): Management of active Crohn disease. In: *JAMA* 309 (20), S. 2150–2158. DOI: 10.1001/jama.2013.4466.

Chow, A. K.; Grubišić, V.; Gulbransen, B. D. (2021): Enteric Glia Regulate Lymphocyte Activation via Autophagy-Mediated MHC-II Expression. In: *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 12 (4), S. 1215–1237. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2021.06.008.

Chow, A. K.; Gulbransen, B. D. (2017): Potential roles of enteric glia in bridging neuroimmune communication in the gut. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 312 (2), G145-G152. DOI: 10.1152/ajpgi.00384.2016.

Cirillo, C.; Sarnelli, G.; Esposito, G.; Grosso, M.; Petruzzelli, R.; Izzo, P. et al. (2009): Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglial-derived S100B protein. In: *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 21 (11), 1209-e112. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2009.01346.x.

Cirillo, C.; Sarnelli, G.; Turco, F.; Mango, A.; Grosso, M.; Aprea, G. et al. (2011): Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglial cells and induces autocrine nitric oxide production. In: *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 23 (9), e372-82. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2011.01748.x.

Collins, P.; Rhodes, J. (2006): Ulcerative colitis: diagnosis and management. In: *BMJ : British Medical Journal* 333 (7563), S. 340–343. DOI: 10.1136/bmj.333.7563.340.

Cornet, A.; Savidge, T. C.; Cabarrocas, J.; Deng, W. L.; Colombel, J. F.; Lassmann, H. et al. (2001): Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (23), S. 13306–13311. DOI: 10.1073/pnas.231474098.

Danese, S.; Fiocchi, C. (2006): Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. In: *World Journal of Gastroenterology : WJG* 12 (30), S. 4807–4812. DOI: 10.3748/wjg.v12.i30.4807.

Deguine, J.; Barton, G. M. (2014): MyD88: a central player in innate immune signaling. In: *F1000Prime Reports* 6, S. 97. DOI: 10.12703/P6-97.

Dignass, A.; Eliakim, R.; Magro, F.; Maaser, C.; Chowers, Y.; Geboes, K. et al. (2012): Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. In: *Journal of Crohn's & colitis* 6 (10), S. 965–990. DOI: 10.1016/j.crohns.2012.09.003.

Dinareello, C. A. (2009): Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. In: *Annual review of immunology* 27, S. 519–550. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612.

Eckburg, P. B.; Bik, E. M.; Bernstein, C. N.; Purdom, E.; Dethlefsen, L.; Sargent, M. et al. (2005): Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. In: *Science (New York, N. Y.)* 308 (5728), S. 1635–1638. DOI: 10.1126/science.1110591.

Egger, B.; Bajaj-Elliott, M.; MacDonald, T. T.; Inglin, R.; Eysselein, V. E.; Büchler, M. W. (2000): Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. In: *Digestion* 62 (4), S. 240–248. DOI: 10.1159/000007822.

Enderes, J.; Neuhaus, H.; Basic, M.; Schneiker, B.; Lysson, M.; Kalff, J. C.; Wehner, S. (2023): Microbiota-dependent presence of murine enteric glial cells requires myeloid differentiation primary response protein 88 signaling. In: *Journal of biosciences* 48.

Esposito, G.; Capoccia, E.; Turco, F.; Palumbo, I.; Lu, J.; Steardo, A. et al. (2014): Palmitoylethanolamide improves colon inflammation through an enteric glia/toll like receptor 4-dependent PPAR- α activation. In: *Gut* 63 (8), S. 1300–1312. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-305005.

Ferri, G. L.; Probert, L.; Cocchia, D.; Michetti, F.; Marangos, P. J.; Polak, J. M. (1982): Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. In: *Nature* 297 (5865), S. 409–410. DOI: 10.1038/297409a0.

Fonseca-Camarillo, G. C.; Villeda-Ramírez, M. A.; Sánchez-Muñoz, F.; Barreto-Zúñiga, R.; Domínguez-López, A.; Uribe-Esquivel, M.; Yamamoto-Furusho, J. K. (2009): Expresion del gen de IL-6 y TNF- α en la mucosa rectal de pacientes con colitis ulcerosa crónica idiopática y controles. In: *Revista de gastroenterología de Mexico* 74 (4), S. 334–340.

- Fuss, I. J.; Neurath, M.; Boirivant, M.; Klein, J. S.; La Motte, C. de; Strong, S. A. et al. (1996): Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 157 (3), S. 1261–1270.
- Garcia, A. D. R.; Doan, N. B.; Imura, T.; Bush, T. G.; Sofroniew, M. V. (2004): GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. In: *Nature neuroscience* 7 (11), S. 1233–1241. DOI: 10.1038/nn1340.
- Garlanda, C.; Dinarello, C. A.; Mantovani, A. (2013): The interleukin-1 family: back to the future. In: *Immunity* 39 (6), S. 1003–1018. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.11.010.
- Geboes, K.; Rutgeerts, P.; Ectors, N.; Mebis, J.; Penninckx, F.; Vantrappen, G.; Desmet, V. J. (1992): Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. In: *Gastroenterology* 103 (2), S. 439–447. DOI: 10.1016/0016-5085(92)90832-J.
- Goetz, M.; Hoffman, A. (2012): Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen-Aktuelle Diagnostik und Therapie. In: *Arzneimitteltherapie* 30 (9), S. 265.
- Greenfeder, S. A.; Nunes, P.; Kwee, L.; Labow, M.; Chizzonite, R. A.; Ju, G. (1995): Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (23), S. 13757–13765. DOI: 10.1074/jbc.270.23.13757.
- Gröne, J. (2019): Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. In: *coloproctology* 41 (1), S. 4. DOI: 10.1007/s00053-018-0327-8.
- Grubišić, V.; McClain, J. L.; Fried, D. E.; Grants, I.; Rajasekhar, P.; Csizmadia, E. et al. (2020): Enteric Glia Modulate Macrophage Phenotype and Visceral Sensitivity following Inflammation. In: *Cell reports* 32 (10), S. 108100. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108100.
- Gulbransen, B. D.; Sharkey, K. A. (2012): Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 9 (11), S. 625–632. DOI: 10.1038/nrgastro.2012.138.

- Heller, F.; Florian, P.; Bojarski, C.; Richter, J.; Christ, M.; Hillenbrand, B. et al. (2005): Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. In: *Gastroenterology* 129 (2), S. 550–564. DOI: 10.1016/j.gastro.2005.05.002.
- Heller, F.; Fromm, A.; Gitter, A. H.; Mankertz, J.; Schulzke, J.-D. (2008): Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. In: *Mucosal immunology* 1 Suppl 1, S58-61. DOI: 10.1038/mi.2008.46.
- Hoess, R. H.; Ziese, M.; Sternberg, N. (1982): P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (11), S. 3398–3402. DOI: 10.1073/pnas.79.11.3398.
- Hoff, S.; Zeller, F.; Weyhern, C. W. H. von; Wegner, M.; Schemann, M.; Michel, K.; Rühl, A. (2008): Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. In: *The Journal of comparative neurology* 509 (4), S. 356–371. DOI: 10.1002/cne.21769.
- Holland, A. M.; Bon-Frauches, A. C.; Keszthelyi, D.; Melotte, V.; Boesmans, W. (2021): The enteric nervous system in gastrointestinal disease etiology. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 78 (10), S. 4713–4733. DOI: 10.1007/s00018-021-03812-y.
- Hou, B.; Reizis, B.; DeFranco, A. L. (2008): Toll-like receptors activate innate and adaptive immunity by using dendritic cell-intrinsic and -extrinsic mechanisms. In: *Immunity* 29 (2), S. 272–282. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.05.016.
- Janeway, C. A.; Medzhitov, R. (2002): Innate immune recognition. In: *Annual review of immunology* 20, S. 197–216. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.
- Jang, D.-I.; Lee, A.-H.; Shin, H.-Y.; Song, H.-R.; Park, J.-H.; Kang, T.-B. et al. (2021): The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. In: *International journal of molecular sciences* 22 (5). DOI: 10.3390/ijms22052719.

- Jessen, K. R.; Mirsky, R. (1985): Glial fibrillary acidic polypeptides in peripheral glia. Molecular weight, heterogeneity and distribution. In: *Journal of neuroimmunology* 8 (4-6), S. 377.
- Joossens, M.; Huys, G.; Cnockaert, M.; Preter, V. de; Verbeke, K.; Rutgeerts, P. et al. (2011): Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. In: *Gut* 60 (5), S. 631–637. DOI: 10.1136/gut.2010.223263.
- Kabouridis, P. S.; Lasrado, R.; McCallum, S.; Chng, S. H.; Snippert, H. J.; Clevers, H. et al. (2015): Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. In: *Neuron* 85 (2), S. 289–295. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.12.037.
- Kannengiesser, K.; Kucharzik, T. (2020): Leitliniengerechte Therapie der Colitis ulcerosa - Update. In: *Gastro-News* 7 (6), S. 30–39. DOI: 10.1007/s15036-020-1396-4.
- Kim, J. J.; Shajib, M. S.; Manocha, M. M.; Khan, W. I. (2012): Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (60). DOI: 10.3791/3678.
- Koelink, P. J.; Wildenberg, M. E.; Stitt, L. W.; Feagan, B. G.; Koldijk, M.; van 't Wout, A. B. et al. (2018): Development of Reliable, Valid and Responsive Scoring Systems for Endoscopy and Histology in Animal Models for Inflammatory Bowel Disease. In: *Journal of Crohn's & colitis* 12 (7), S. 794–803. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjy035.
- Kolls, J. K.; Lindén, A. (2004): Interleukin-17 family members and inflammation. In: *Immunity* 21 (4), S. 467–476. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.08.018.
- Koretz, K.; Momburg, F.; Otto, H. F.; Möller, P. (1987): Sequential induction of MHC antigens on autochthonous cells of ileum affected by Crohn's disease. In: *The American Journal of Pathology* 129 (3), S. 493–502.
- Kovler, M. L.; Gonzalez Salazar, A. J.; Fulton, W. B.; Lu, P.; Yamaguchi, Y.; Zhou, Q. et al. (2021): Toll-like receptor 4-mediated enteric glia loss is critical for the development of necrotizing enterocolitis. In: *Science translational medicine* 13 (612), eabg3459. DOI: 10.1126/scitranslmed.abg3459.
- Koziczak-Holbro, M.; Joyce, C.; Glück, A.; Kinzel, B.; Müller, M.; Gram, H. (2008): Solving the IRAK-4 Enigma: Application of Kinase-Dead Knock-In Mice. In: Gottfried

Baier und Burkhart Schraven (Hg.): Sparking signals. Kinases as molecular signaltransducers and pharmacological drug targets in inflammation, 2007/3. Berlin: Springer (Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings, 2007,3), S. 263–282.

Kucharzik, T.; Dignass, A. U.; Atreya, R.; Bokemeyer, B.; Esters, P.; Herrlinger, K. et al. (2019): Aktualisierte S3-Leitlinie Colitis ulcerosa. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 57 (11), S. 1321–1405. DOI: 10.1055/a-1015-7265.

Lachmann, H. J.; Lowe, P.; Felix, S. D.; Rordorf, C.; Leslie, K.; Madhoo, S. et al. (2009): In vivo regulation of interleukin 1beta in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. In: *The Journal of experimental medicine* 206 (5), S. 1029–1036. DOI: 10.1084/jem.20082481.

Leslie, W. D.; Miller, N.; Rogala, L.; Bernstein, C. N. (2008): Vitamin D status and bone density in recently diagnosed inflammatory bowel disease: the Manitoba IBD Cohort Study. In: *The American journal of gastroenterology* 103 (6), S. 1451–1459. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01753.x.

Lindgren, S.; Löfberg, R.; Bergholm, L.; Hellblom, M.; Carling, L.; Ung, K. A. et al. (2002): Effect of budesonide enema on remission and relapse rate in distal ulcerative colitis and proctitis. In: *Scandinavian journal of gastroenterology* 37 (6), S. 705–710. DOI: 10.1080/00365520212512.

Lübbbers, H.; Mahlke, R.; Lankisch, P. G.; Stolte, M. (2010): Follow-up endoscopy in gastroenterology: when is it helpful? In: *Deutsches Arzteblatt international* 107 (3), S. 30–39. DOI: 10.3238/aerztebl.2010.0030.

Lucas, K.; Maes, M. (2013): Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. In: *Molecular neurobiology* 48 (1), S. 190–204. DOI: 10.1007/s12035-013-8425-7.

Magro, F.; Langner, C.; Driessen, A.; Ensari, A.; Geboes, K.; Mantzaris, G. J. et al. (2013): European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. In: *Journal of Crohn's & colitis* 7 (10), S. 827–851. DOI: 10.1016/j.crohns.2013.06.001.

Manthey, C. F.; Reher, D.; Huber, S. (2021): Was ist gesichert in der Therapie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. In: *Der Internist* 62 (12), S. 1269–1279. DOI: 10.1007/s00108-021-01207-6.

- Matsuoka, K.; Kobayashi, T.; Ueno, F.; Matsui, T.; Hirai, F.; Inoue, N. et al. (2018): Evidence-based clinical practice guidelines for inflammatory bowel disease. In: *Journal of gastroenterology* 53 (3), S. 305–353. DOI: 10.1007/s00535-018-1439-1.
- McCormack, G.; Moriarty, D.; O'Donoghue, D. P.; McCormick, P. A.; Sheahan, K.; Baird, A. W. (2001): Tissue cytokine and chemokine expression in inflammatory bowel disease. In: *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 50 (10), S. 491–495. DOI: 10.1007/PL00000223.
- Meir, M.; Kannapin, F.; Diefenbacher, M.; Ghoreishi, Y.; Kollmann, C.; Flemming, S. et al. (2021): Intestinal Epithelial Barrier Maturation by Enteric Glial Cells Is GDNF-Dependent. In: *International journal of molecular sciences* 22 (4). DOI: 10.3390/ijms22041887.
- Melgar, S.; Karlsson, A.; Michaëlsson, E. (2005): Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 288 (6), G1328-38. DOI: 10.1152/ajpgi.00467.2004.
- Menees, S. B.; Powell, C.; Kurlander, J.; Goel, A.; Chey, W. D. (2015): A meta-analysis of the utility of C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, fecal calprotectin, and fecal lactoferrin to exclude inflammatory bowel disease in adults with IBS. In: *The American journal of gastroenterology* 110 (3), S. 444–454. DOI: 10.1038/ajg.2015.6.
- Miampamba, M.; Sharkey, K. A. (1999): c-Fos expression in the myenteric plexus, spinal cord and brainstem following injection of formalin in the rat colonic wall. In: *Journal of the Autonomic Nervous System* 77 (2-3), S. 140–151. DOI: 10.1016/S0165-1838(99)00048-X.
- Mitselou, A.; Grammeniatis, V.; Varouktsi, A.; Papadatos, S. S.; Katsanos, K.; Galani, V. (2020): Proinflammatory cytokines in irritable bowel syndrome: a comparison with inflammatory bowel disease. In: *Intestinal research* 18 (1), S. 115–120. DOI: 10.5217/ir.2019.00125.
- Moller, F. T.; Andersen, V.; Wohlfahrt, J.; Jess, T. (2015): Familial risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study 1977-2011. In: *The American journal of gastroenterology* 110 (4), S. 564–571. DOI: 10.1038/ajg.2015.50.

Molodecky, N. A.; Soon, I. S.; Rabi, D. M.; Ghali, W. A.; Ferris, M.; Chernoff, G. et al. (2012): Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. In: *Gastroenterology* 142 (1), 46-54.e42; quiz e30. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.10.001.

Monteleone, M.; Stow, J. L.; Schroder, K. (2015): Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. In: *Cytokine* 74 (2), S. 213–218. DOI: 10.1016/j.cyto.2015.03.022.

Narayanan, K. B.; Park, H. H. (2015): Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-mediated cellular signaling pathways. In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 20 (2), S. 196–209. DOI: 10.1007/s10495-014-1073-1.

Netea, M. G.; Nold-Petry, C. A.; Nold, M. F.; Joosten, L. A. B.; Opitz, B.; van der Meer, J. H. M. et al. (2009): Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. In: *Blood* 113 (10), S. 2324–2335. DOI: 10.1182/blood-2008-03-146720.

Ochoa-Cortes, F.; Turco, F.; Linan-Rico, A.; Soghomonyan, S.; Whitaker, E.; Wehner, S. et al. (2016): Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. In: *Inflammatory bowel diseases* 22 (2), S. 433–449. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000667.

Ogura, Y.; Bonen, D. K.; Inohara, N.; Nicolae, D. L.; Chen, F. F.; Ramos, R. et al. (2001): A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. In: *Nature* 411 (6837), S. 603–606. DOI: 10.1038/35079114.

Okayasu, I.; Hatakeyama, S.; Yamada, M.; Ohkusa, T.; Inagaki, Y.; Nakaya, R. (1990): A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98(3), 694-702. In: *Gastroenterology* 98 (3), S. 694–702. DOI: 10.1016/0016-5085(90)90290-H.

Ordás, I.; Eckmann, L.; Talamini, M.; Baumgart, D. C.; Sandborn, W. J. (2012): Ulcerative colitis. In: *Lancet (London, England)* 380 (9853), S. 1606–1619. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60150-0.

Ortwein, J.; Laffolie, J. de; Zimmer, K.-P. (2017): The Cobblestone Sign in a Child with Crohn's Disease. In: *Deutsches Arzteblatt international* 114 (27-28), S. 472. DOI: 10.3238/arztebl.2017.0472.

Özbek, M.; Bozkurt, M. F.; Beyaz, F.; Ergün, E.; Ergün, L. (2018): Expression profile of some neuronal and glial cell markers in the ovine ileal enteric nervous system during prenatal development. In: *Acta histochemica* 120 (8), S. 768–779. DOI: 10.1016/j.acthis.2018.09.002.

Parameswaran, N.; Patial, S. (2010): Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. In: *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 20 (2), S. 87–103. DOI: 10.1615/critreveukargeneexpr.v20.i2.10.

Perše, M.; Cerar, A. (2012): Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012, S. 718617. DOI: 10.1155/2012/718617.

Petagna, L.; Antonelli, A.; Ganini, C.; Bellato, V.; Campanelli, M.; Divizia, A. et al. (2020): Pathophysiology of Crohn's disease inflammation and recurrence. In: *Biology direct* 15 (1), S. 23. DOI: 10.1186/s13062-020-00280-5.

Peyrin-Biroulet, L.; Cieza, A.; Sandborn, W. J.; Coenen, M.; Chowers, Y.; Hibi, T. et al. (2012): Development of the first disability index for inflammatory bowel disease based on the international classification of functioning, disability and health. In: *Gut* 61 (2), S. 241–247. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300049.

Rahman, M. M.; McFadden, G. (2006): Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. In: *PLoS pathogens* 2 (2), e4. DOI: 10.1371/journal.ppat.0020004.

Rajewsky, K.; Gu, H.; Kühn, R.; Betz, U. A.; Müller, W.; Roes, J.; Schwenk, F. (1996): Conditional gene targeting. In: *The Journal of clinical investigation* 98 (3), S. 600–603. DOI: 10.1172/JCI118828.

Rakoff-Nahoum, S.; Paglino, J.; Eslami-Varzaneh, F.; Edberg, S.; Medzhitov, R. (2004): Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. In: *Cell* 118 (2), S. 229–241. DOI: 10.1016/j.cell.2004.07.002.

- Rao, M.; Nelms, B. D.; Dong, L.; Salinas-Rios, V.; Rutlin, M.; Gershon, M. D.; Corfas, G. (2015): Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. In: *Glia* 63 (11), S. 2040–2057. DOI: 10.1002/glia.22876.
- Reimund, J. M.; Wittersheim, C.; Dumont, S.; Muller, C. D.; Baumann, R.; Poindron, P.; Duclos, B. (1996): Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. In: *Journal of clinical immunology* 16 (3), S. 144–150. DOI: 10.1007/BF01540912.
- Robson, M. J.; Zhu, C.-B.; Quinlan, M. A.; Botschner, D. A.; Baganz, N. L.; Lindler, K. M. et al. (2016): Generation and Characterization of Mice Expressing a Conditional Allele of the Interleukin-1 Receptor Type 1. In: *PloS one* 11 (3), e0150068. DOI: 10.1371/journal.pone.0150068.
- Rosenbaum, C.; Schick, M. A.; Wollborn, J.; Heider, A.; Scholz, C.-J.; Cecil, A. et al. (2016): Activation of Myenteric Glia during Acute Inflammation In Vitro and In Vivo. In: *PloS one* 11 (3), e0151335. DOI: 10.1371/journal.pone.0151335.
- Rosenberg, H. J.; Rao, M. (2021): Enteric glia in homeostasis and disease: From fundamental biology to human pathology. In: *iScience* 24 (8), S. 102863. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102863.
- Rühl, A.; Franzke, S.; Collins, S. M.; Stremmel, W. (2001): Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 280 (6), G1163-71. DOI: 10.1152/ajpgi.2001.280.6.G1163.
- Rühl, A.; Nasser, Y.; Sharkey, K. A. (2004): Enteric glia. In: *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 16 Suppl 1, S. 44–49. DOI: 10.1111/j.1743-3150.2004.00474.x.
- Salim, S. Y.; Söderholm, J. D. (2011): Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. In: *Inflammatory bowel diseases* 17 (1), S. 362–381. DOI: 10.1002/ibd.21403.
- Sartor, R. B. (2006): Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. In: *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology* 3 (7), S. 390–407. DOI: 10.1038/ncpgasthep0528.

- Satsangi, J.; Silverberg, M. S.; Vermeire, S.; Colombel, J.-F. (2006): The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. In: *Gut* 55 (6), S. 749–753. DOI: 10.1136/gut.2005.082909.
- Savidge, T. C.; Newman, P.; Pothoulakis, C.; Ruhl, A.; Neunlist, M.; Bourreille, A. et al. (2007): Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. In: *Gastroenterology* 132 (4), S. 1344–1358. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.01.051.
- Scheinecker, C. (2015): Autoinflammatorische Syndrome bei Erwachsenen. In: *rheuma plus* 14 (4), S. 95–99. DOI: 10.1007/s12688-015-0030-6.
- Schneider, R.; Leven, P.; Glowka, T.; Kuzmanov, I.; Lysson, M.; Schneiker, B. et al. (2021): A novel P2X2-dependent purinergic mechanism of enteric gliosis in intestinal inflammation. In: *EMBO Molecular Medicine* 13 (1), e12724. DOI: 10.15252/emmm.202012724.
- Schneider, R.; Leven, P.; Mallesh, S.; Breßer, M.; Schneider, L.; Mazzotta, E. et al. (2022): IL-1-dependent enteric gliosis guides intestinal inflammation and dysmotility and modulates macrophage function. In: *Communications biology* 5 (1), S. 811. DOI: 10.1038/s42003-022-03772-4.
- Schnorbach, M.-T.; Kruis, W. (2021): Krankheitskosten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen in Deutschland. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 59 (11), S. 1173–1188. DOI: 10.1055/a-1174-0670.
- Seguella, L.; Gulbransen, B. D. (2021): Enteric glial biology, intercellular signalling and roles in gastrointestinal disease. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 18 (8), S. 571–587. DOI: 10.1038/s41575-021-00423-7.
- Shahini, A.; Shahini, A. (2023): Role of interleukin-6-mediated inflammation in the pathogenesis of inflammatory bowel disease: focus on the available therapeutic approaches and gut microbiome. In: *Journal of cell communication and signaling* 17 (1), S. 55–74. DOI: 10.1007/s12079-022-00695-x.
- Shaw, S. Y.; Blanchard, J. F.; Bernstein, C. N. (2010): Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. In: *The*

American journal of gastroenterology 105 (12), S. 2687–2692. DOI:

10.1038/ajg.2010.398.

Shi, Y.-J.; Gong, H.-F.; Zhao, Q.-Q.; Liu, X.-S.; Liu, C.; Wang, H. (2019): Critical role of toll-like receptor 4 (TLR4) in dextran sulfate sodium (DSS)-Induced intestinal injury and repair. In: *Toxicology letters* 315, S. 23–30. DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.08.012.

Siegmund, B.; Lehr, H. A.; Fantuzzi, G.; Dinarello, C. A. (2001): IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (23), S. 13249–13254. DOI: 10.1073/pnas.231473998.

Sims, J. E.; Smith, D. E. (2010): The IL-1 family: regulators of immunity. In: *Nat Rev Immunol* 10 (2), S. 89–102. DOI: 10.1038/nri2691.

So, A.; Smedt, T. de; Revaz, S.; Tschopp, J. (2007): A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. In: *Arthritis Research & Therapy* 9 (2), R28. DOI: 10.1186/ar2143.

Stakenborg, M.; Abdurahiman, S.; Simone, V. de; Goverse, G.; Stakenborg, N.; van Baarle, L. et al. (2022): Enteric glial cells favor accumulation of anti-inflammatory macrophages during the resolution of muscularis inflammation. In: *Mucosal immunology*. DOI: 10.1038/s41385-022-00563-2.

Stark, R.; König, H.-H.; Leidl, R. (2006): Costs of inflammatory bowel disease in Germany. In: *Pharmacoeconomics* 24 (8), S. 797–814. DOI: 10.2165/00019053-200624080-00006.

Steinkamp, M.; Geerling, I.; Seufferlein, T.; Boyen, G. von; Egger, B.; Grossmann, J. et al. (2003): Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. In: *Gastroenterology* 124 (7), S. 1748–1757. DOI: 10.1016/s0016-5085(03)00404-9.

Sternberg, N.; Hamilton, D. (1981): Bacteriophage P1 site-specific recombination. In: *Journal of Molecular Biology* 150 (4), S. 467–486. DOI: 10.1016/0022-2836(81)90375-2.

Stoffels, B.; Hupa, K. J.; Snoek, S. A.; van Bree, S.; Stein, K.; Schwandt, T. et al. (2014): Postoperative ileus involves interleukin-1 receptor signaling in enteric glia. In: *Gastroenterology* 146 (1), 176-87.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.09.030.

- Sturm, A.; Atreya, R.; Bettenworth, D.; Bokemeyer, B.; Dignaß, A.; Eehalt, R. et al. (2022): Aktualisierte S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) – August 2021 – AWMF-Registernummer: 021-004. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 60 (3), S. 332–418. DOI: 10.1055/a-1713-3941.
- Takeda, K.; Akira, S. (2004): TLR signaling pathways. In: *Seminars in immunology* 16 (1), S. 3–9. DOI: 10.1016/j.smim.2003.10.003.
- Tanaka, T.; Narazaki, M.; Kishimoto, T. (2014): IL-6 in inflammation, immunity, and disease. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6 (10), a016295. DOI: 10.1101/cshperspect.a016295.
- Thia, K. T.; Sandborn, W. J.; Harmsen, W. S.; Zinsmeister, A. R.; Loftus, E. V. (2010): Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. In: *Gastroenterology* 139 (4), S. 1147–1155. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.06.070.
- Torres, J.; Mehandru, S.; Colombel, J.-F.; Peyrin-Biroulet, L. (2017): Crohn's disease. In: *Lancet (London, England)* 389 (10080), S. 1741–1755. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31711-1.
- Turco, F.; Sarnelli, G.; Cirillo, C.; Palumbo, I.; Giorgi, F. de; D'Alessandro, A. et al. (2014): Enteroglia-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells. In: *Gut* 63 (1), S. 105–115. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302090.
- Ungaro, R.; Mehandru, S.; Allen, P. B.; Peyrin-Biroulet, L.; Colombel, J.-F. (2017): Ulcerative colitis. In: *The Lancet* 389 (10080), S. 1756–1770. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32126-2.
- Vassalli, P. (1992): The pathophysiology of tumor necrosis factors. In: *Annual review of immunology* 10, S. 411–452. DOI: 10.1146/annurev.iy.10.040192.002211.
- Veauthier, B.; Hornecker, JR (2018): Crohn's Disease: Diagnosis and Management. In: *American family physician* 98 (11). Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30485038/>.

- Vijay, K. (2018): Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. In: *International Immunopharmacology* 59, S. 391–412. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.03.002.
- Wang, J. Q.; Jeelall, Y. S.; Ferguson, L. L.; Horikawa, K. (2014): Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 367. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00367.
- Weber, A.; Wasiliew, P.; Kracht, M. (2010): Interleukin-1 (IL-1) pathway. In: *Science signaling* 3 (105), cm1. DOI: 10.1126/scisignal.3105cm1.
- Wehkamp, J.; Götz, M.; Herrlinger, K.; Steurer, W.; Stange, E. F. (2016): Inflammatory Bowel Disease. In: *Deutsches Arzteblatt international* 113 (5), S. 72–82. DOI: 10.3238/arztebl.2016.0072.
- Wehner, S.; Behrendt, F. F.; Lyutenski, B. N.; Lysson, M.; Bauer, A. J.; Hirner, A.; Kalff, J. C. (2007): Inhibition of macrophage function prevents intestinal inflammation and postoperative ileus in rodents. In: *Gut* 56 (2), S. 176–185. DOI: 10.1136/gut.2005.089615.
- Winkler, S.; Hedrich, C. M.; Rösen-Wolff, A. (2016): Caspase-1 als Regulator der Autoinflammation bei rheumatischen Erkrankungen. In: *Zeitschrift für Rheumatologie* 75 (3), S. 265–275. DOI: 10.1007/s00393-016-0077-3.
- Xiao, Y.-T.; Yan, W.-H.; Cao, Y.; Yan, J.-K.; Cai, W. (2016): Neutralization of IL-6 and TNF- α ameliorates intestinal permeability in DSS-induced colitis. In: *Cytokine* 83, S. 189–192. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.04.012.
- Yamamoto, M.; Yoshizaki, K.; Kishimoto, T.; Ito, H. (2000): IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164 (9), S. 4878–4882. DOI: 10.4049/jimmunol.164.9.4878.
- Yeshi, K.; Ruscher, R.; Hunter, L.; Daly, N. L.; Loukas, A.; Wangchuk, P. (2020): Revisiting Inflammatory Bowel Disease: Pathology, Treatments, Challenges and Emerging Therapeutics Including Drug Leads from Natural Products. In: *Journal of clinical medicine* 9 (5). DOI: 10.3390/jcm9051273.

Yu, W.; Su, X.; Chen, W.; Tian, X.; Zhang, K.; Guo, G. et al. (2019): Three types of gut bacteria collaborating to improve Kui Jie'an enema treat DSS-induced colitis in mice. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 113, S. 108751.

DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108751.

Zhang, Y.-Z.; Li, Y.-Y. (2014): Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. In: *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20 (1), S. 91–99. DOI: 10.3748/wjg.v20.i1.91.

9. Danksagung

Ich danke dem ganzen Laborteam der AG Wehner - insbesondere Reiner, Mariola, Bianca, Patrik, Patrick, Jana und Sven. Vielen Dank für Eure ganze Arbeit und Unterstützung! Danke auch an meine Familie, die immer an mich geglaubt hat. Gesonderter Dank gilt meiner Oma, Eva-Maria Papp.