

Aus dem Institut für Klinische Molekularbiologie
(Direktor: Prof. Dr. Schreiber)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

UNTERSUCHUNG ZUR FUNKTION DES
G-PROTEIN GEKOPPELTEN REZEPTORS
(GPR) 43
IM INTESTINALLEN ENTZÜNDUNGSMODELL

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

vorgelegt von

MATTI FÖRSTER

aus **HAMBURG**

Kiel 2011

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rosenstiel, Institut für Klinische
Molekularbiologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Grötzinger, Institut für Biochemie

Tag der mündlichen Prüfung: 1.2.2012

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 2.2.2012

gez. Prof. Dr. Dr. Cascorbi

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass meine Dissertation mit dem Thema:

Untersuchung zur Funktion des G-Protein gekoppelten Rezeptors (GPR) 43 im intestinalen Entzündungsmodell

abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe. Teile der hier vorgestellten Ergebnisse sind bereits im *Journal of Immunology*, 2009 Dec 1:183(11):7514-22. Epub 2009 Nov 16, veröffentlicht und wurden auf der *Leiden International Medical Students Conference (LIMSC) 2009* sowie der *Digestive Disease Week 2010* in Form eines Vortrages und auf der *Exzellenzclusterkonferenz 2009* in Form eines Posters präsentiert.

Ich widerspreche nicht nach §5, Abs. 2k der Promotionsordnung der Teilnahme von Zuhörern an der mündlichen Doktorprüfung.

Matti Förster

Kiel, den 02.02.2012

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis & Termini technici	iii
Nomenklatur von Genen und Proteinen	iv
Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	v
1. Einleitung	1
1.1. Chronisch entzündliche Darmkrankheiten.....	1
1.1.1. Aktueller Stand der Forschung	1
1.1.2. Epidemiologie.....	2
1.1.3. Risikofaktoren	3
1.2. Der Verdauungstrakt – Organ zwischen Toleranz und Abwehr.....	6
1.2.1. Darmflora	6
1.2.2. Kurzkettige Fettsäuren	7
1.2.3. Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase	8
1.3. Neutrophile Granulozyten	9
1.3.1. Chemotaxis und Interleukin (IL-)8.....	10
1.3.2. Migration	11
1.4. Der SCFA-Rezeptor GPR43 und seine Rolle in CED.....	12
1.5. Fragestellung	14
2. Methoden	15
2.1. Materialien	15
2.2. Mäuse	15
2.3. DSS-Colitis	15
2.3.1. Induktion einer Colitis mit Natriumdextransulfat (DSS)	16
2.4. Klinischer Index (Disease Activity Index, DAI).....	17
2.5. Koloskopie	17
2.6. Mäusepräparation	18
2.7. Histopathologische und immunhistologische Analyse von Kolonschnitten.	19
2.7.1. Vorbereitung.....	19
2.7.2. Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung.....	19
2.7.3. Histologischer Index	20
2.7.4. Antikörperfärbung.....	20
2.8. Immunchemische Methoden	21
2.8.1. Zytokin-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	21
2.8.2. Myeloperoxidase (MPO)-Aktivitäts-Messung	22
2.8.3. L-Selektin-Quantifizierung durch Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	22
2.9. Arbeiten mit DNA und RNA	23
2.9.1. RNA-Isolation, cDNA-Synthese und Polymerasekettenreaktion (PCR).....	23
2.9.2. Agarose-Gelelektrophorese.....	25
2.10. Proteinbiochemische Methoden	25
2.10.1. Herstellung von Proteinlysaten	25
2.10.2. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	26
2.10.3. Immunodetektion.....	27
2.11. Chemotaxis-Messung	27
2.11.1. Vorbereitungen.....	27
2.11.2. Modifizierter Boyden-Kammer-Assay	28
2.12. Statistik.....	28

3. Ergebnisse	29
3.1. Charakterisierung des basalen Phänotyps von Gpr43^{-/-}-Mäusen	29
3.2. Akute Colitis	32
3.2.1. Phänotyp.....	32
3.2.2. Beurteilung der Infiltration von PMNs	34
3.2.3. Molekulare Marker der Entzündung.....	35
3.3. Chronische Colitis	38
3.3.1. Phänotyp.....	38
3.3.2. Beurteilung der Infiltration von PMN	40
3.3.3. Molekulare Marker der Entzündung.....	41
3.4. Funktionsanalyse von Gpr43^{-/-}-Zellen	43
3.4.1. Gpr43-Abhängigkeit in der Migration	43
3.4.2. p38-Aktivierung	45
3.4.3. Gpr43-abhängiges L-Selektin-Shedding.....	46
4. Diskussion	48
4.1. Wahl des Colitis-Modells und Evaluation der Gendeletion	49
4.2. Funktion von Gpr43 in DSS-Colitis-Modellen	50
4.2.1. Gpr43-Defizienz führt im akuten Modell zu erhöhter Todesrate durch Bakteriämie	50
4.2.2. Einfluss der reduzierten Migrationsfähigkeit der PMN auf die chronische Entzündungsreaktion	51
4.3. Funktionelle Analyse der Gpr43-Defizienz	53
4.3.1. Gpr43-Defizienz verhindert SCFA-abhängige Migration ex vivo	53
4.3.2. Proteinkinase p38 als wichtiger Mediator in der Gpr43-vermittelten Chemotaxis	54
4.3.3. Gpr43 ist essentiell für L-Selektin-Shedding.....	55
4.4. Ausblick	56
4.5. Beantwortung der Fragestellung	58
5. Zusammenfassung	59
6. Summary	61
7. Literaturverzeichnis	63
8. Anhang – verwendete Materialien	74
8.1. Verwendete Puffer, Lösungen und Medien	74
8.2. Verwendete Chemikalien, Zusätze und Enzyme	75
8.3. Verwendete Kits	77
9. Danksagungen	79
10. Lebenslauf	80

Abkürzungsverzeichnis & Termini technici

BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CARD	Caspase recruitment domain
CD	Crohn's disease
CDAI	Crohn's disease activity index
cDNA	Complementary DNA
CED	Chronisch entzündliche Darmkrankheiten
COC	Colon organ culture, Kolonkultur
CSF	Colony stimulating factor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLG	Disc large gene
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSS	Natriumdextransulfat
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescent activated cell sorting
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucin-Phenylalanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GPR	G-Protein coupled receptor
GTP	Guanosintriphosphat
GWAS	Genome wide association scan
Hb	Hämoglobin
HLA	Human leucocyte antigen
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KC	Keratinocyte-derived Cytokine
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin rich region
MAPK	Mitogen activated protein kinase
Min.	Minute

MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger RNA
NF- κ B	Nuclear factor kappa b
NLR	NOD-like receptor
NOD	Nucleotide oligomerization domain
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Para-Formaldehyd
PMN(C)	Polymorphnuclear cell
Pooling	Zusammenführen von mehreren Proben
PRR	Pattern recognition receptors
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerization chain reaction
RTase	Reverse Transkriptase
SCFA	Short chain fatty acid
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl Phosphat
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAE	Tris-Acetat-EDTA
template	Probe, Vorlage
TLR	Toll like receptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNBS	Trinitrobenzonsulfatsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
TTBS	Tween + Tris-buffered saline
w/v	weight per volume
well	Vertiefung in einer Reaktionsplatte

Nomenklatur von Genen und Proteinen

Mensch: *GEN* (z.B. *GPR43*), *PROTEIN* (z.B. *GPR43*)

Maus: *Gen* (z.B. *Gpr43*), *Protein* (z.B. *Gpr43*)

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: EPIDEMIOLOGIE VON CED.	2
ABB. 2: GPR43 ^{-/-} -MÄUSE ZEIGEN KEINE SPONTANEN VERÄNDERUNGEN IN DER MUKOSA ODER IM GEWICHT AUF.	30
ABB. 3: NACHWEIS DER GPR43-DELETION AUF CDNA (A) UND PROTEIN-EBENE (B).	31
ABB. 4: ERHÖHTE LETALITÄT UND SCHWERE DER COLITIS BEI GPR43 ^{-/-} -MÄUSEN.	32
ABB. 5: MILDERER BEFALL DER GPR43 ^{-/-} -MÄUSE IM AKUTEN COLITISMODELL.	33
ABB. 6: REDUZIERTES SUBMUKOSALES ENTZÜNDUNGSGESCHEHEN UND VERMINDERTE PMN-INFILTRATION VON GPR43 ^{-/-} -MÄUSEN IN DER HISTOLOGIE.	35
ABB. 7: VERMINDERTE ZYTOKINPRODUKTION UND MPO-AKTIVITÄT IN KOLONGEWEBE DER GPR43 ^{-/-} -MÄUSE BEI ERHÖHTER ZYTOKINKONZENTRATION IM SERUM.	36
ABB. 8: GERINGERE ENTZÜNDUNGSAKTIVITÄT BEI GPR43 ^{-/-} -MÄUSEN IM CHRONISCHEN COLITISMODELL.	38
ABB. 9: MILDERER BEFALL DER GPR43 ^{-/-} -MÄUSE IM CHRONISCHEN COLITIS-MODELL.	39
ABB. 10: REDUZIERTER INFILTRATION UND ENTZÜNDUNG IM COLON DER GPR43 ^{-/-} -MÄUSE.	41
ABB. 11: ZEICHEN EINER MILDEREN ENTZÜNDUNG IN GPR43 ^{-/-} -MÄUSEN AUF MOLEKULARER EBENE.	42
ABB. 12: GPR43 ^{-/-} -PMN ZEIGEN REDUZIERTES MIGRATIONSVERHALTEN IN RICHTUNG SCFA UND IN WILD-TYP-PMN WIRD DURCH KOSTIMULATION VERSTÄRKT HERVORGERUFEN.	44
ABB. 13: VERMINDERTE P38-AKTIVIERUNG IN GPR43 ^{-/-} -PMN.	45
ABB. 14: P38-INHIBITION FÜHRT ZU VERMINDERTER MIGRATION BEI STIMULATION MIT PROPIONAT.	46
ABB. 15: L-SELEKTIN-SHEDDING WIRD DURCH SCFA GPR43-ABHÄNGIG AUSGELÖST.	47
ABB. 16: NACHWEIS BAKTERIELLER TRANSLOKATION ÜBER DAS EPITHEL IN LEBER UND MILZ IN GPR43 ^{-/-} -MÄUSEN WÄHREND EINER 4%-DSS-COLITIS.	51

Tabellenverzeichnis

TAB. 1: AUSGEWÄHLTE GENE BZW. DEREN KODIERTE PROTEINE, DIE EINE SCHLÜSSELROLLE IN DER ÄTIOLOGIE VON CED INNEHABEN.	4
TAB. 2: VERTEILUNG DER KOHORTEN.	16
TAB. 3: DISEASE ACTIVITY INDEX (DAI).	17
TAB. 4: ENDOSKOPISCHER INDEX.	17
TAB. 5: HISTOLOGISCHER INDEX.	20
TAB. 6: RT-PCR-ANSATZ.	23
TAB. 7: PCR-ANSATZ.	24
TAB. 8: PCR-PROGRAMM.	25
TAB. 9: BEZEICHNUNG UND ZUSAMMENSETZUNG VERWENDETER PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN.	74
TAB. 10: BEZEICHNUNG UND NAME DES HERSTELLERS VERWENDETER CHEMIKALIEN, ZUSÄTZE UND ENZYME.	75
TAB. 11: VERWENDETE ANTIKÖRPER.	77
TAB. 12: BEZEICHNUNG UND NAME DES HERSTELLERS VERWENDETER GERÄTE.	77
TAB. 13: BEZEICHNUNG UND NAME DES HERSTELLERS VERWENDETER KITS.	77

1. Einleitung

1.1. *Chronisch entzündliche Darmkrankheiten*

1.1.1. *Aktueller Stand der Forschung*

Colitis ulcerosa (Ulcerative colitis, UC) und Morbus Crohn (Crohn's disease, CD) stellen die wichtigsten Entitäten der Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) dar. Seit Beginn der 1920er Jahre wird in der westlichen Welt eine sprunghafte Erhöhung der Inzidenz beider bis heutzutage noch unheilbarer Krankheiten festgestellt (1, 2).

Burril B. Crohn gilt als Erstbeschreiber der Symptome der Ileitis terminalis (1923), für welche er später Namensgeber wurde (3). Leitsymptome der CED sind neben dem Auftreten von unspezifischen Allgemeinsymptomen krampfartige Bauchschmerzen und Diarrhöen sowie Maldigestion. Ein chronisch-rezidivierender Verlauf mit akuten Entzündungsschüben ist pathognomisch (4). Zusätzlich können extraintestinale Begleiterscheinungen wie Arthritis, Aphten, Trommelschlägelfinger, Pyoderma gangraenosum, Erythema nodosum, Iritis, Episkleritis, Uveitis sowie Gallen- und Nierensteine auftreten. Beiden Erkrankungsformen ist ein erhöhtes Darmkrebsrisiko gemein, während die Lebenserwartung kaum beeinträchtigt ist (5). Im Gegensatz zur UC, bei der das Colon kontinuierlich betroffen ist, beobachtet man bei CD eine diskontinuierliche Ausbreitung über den gesamten Gastrointestinaltrakt.

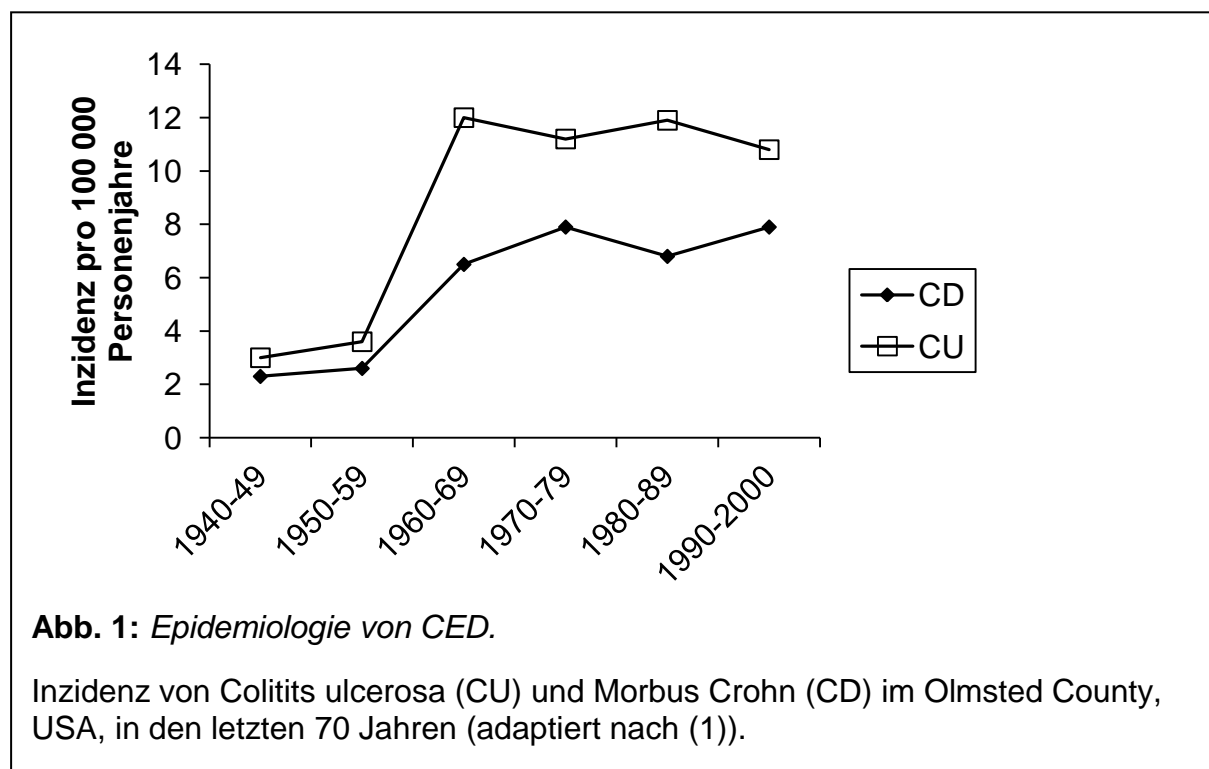
Obgleich in den letzten Jahren wegweisende Ergebnisse in der Genetik der CED erzielt werden konnten, ist die Pathogenese trotz intensiver Forschung noch weitgehend ungeklärt. Die derzeitige Entstehungshypothese geht davon aus, dass auf dem Boden einer genetischen Suszeptibilität die Barrierefunktion der intestinalen Mucosa gestört ist. Die Konsequenz ist eine inadäquate Interaktion zwischen der bakteriellen Darmflora und den intestinalen Epithelzellen, was zur Ausbildung einer chronischen Entzündungsreaktion führt (6). Ein wichtiger Faktor dabei ist die erhöhte bakterielle Translokation, die sowohl bei Patienten mit CD als auch mit UC beobachtet wird (7-9). Hieraus resultiert eine erhöhte Aktivierung von Entzündungszellen, die aus den umliegenden Geweben, insbesondere aus den Blutgefäßen in die Mucosa einwandern. Aktivierung und Migration dieser Zellen unterliegen vielfachen Regulationsmechanismen. Ein wichtiger Faktor bei der

Aktivierung von Leukozyten, insbesondere von polymorphnukleären Zellen (PMN), sind kurzkettige Fettsäuren (SCFA), die mit hoher Spezifität durch den G-Proteingekoppelten Rezeptor (GPR) 43 erkannt werden (10, 11).

Eine medikamentöse Heilung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist heute noch nicht möglich. Der klassische therapeutische Ansatz umfasst die Gabe von Kortison- oder Mesalazinpräparaten. Erweitert wird das Behandlungsregime bei chronisch-aktiven Verläufen durch Immunsuppressiva wie Azathioprin oder 6-Mercaptopurin. Neu hinzugekommen sind in den letzten Jahren sog. *Biologicals* wie die TNF- α -Antikörper Infliximab und Adalimumab sowie der Integrininhibitor Natalizumab; weitere *Biologicals* werden aktuell in Studien getestet (u.a. Ustekinumab). Sie stellen sehr effektive immunmodulierende Medikamente dar, deren gemeinsamer Ansatz die spezifische Blockierung bestimmter molekularer Strukturen ist, die wiederum an der Entzündungsantwort der Körpers beteiligt sind (4).

1.1.2. Epidemiologie

CED stellen ein wachsendes medizinisches und sozioökonomisches Problem der Industrienationen und in den letzten Jahren vermehrt auch der Entwicklungsländer dar (s. Abb. 1). In Nordamerika und Nordwesteuropa besteht mittlerweile eine stabile



Lebenszeitprävalenz von 0,2% (12). In Ländern des südlichen Europas, Asiens und in den meisten Entwicklungsländern steigt die Zahl der Neuerkrankungen nach wie vor an (1). Im Gegensatz zu den Infektionskrankheiten, die im Laufe des letzten Jahrhunderts effektiv zurückgedrängt wurden, zeigen CED ähnlich wie andere Krankheiten (z.B. Asthma bronchiale)(13), die sich durch eine chronische Überaktivierung des Immunsystems auszeichnen, weltweit weiterhin eine steigende Inzidenz (14). Ferner weisen epidemiologische Daten auf unterschiedliche Krankheitssuszeptibilität bei unterschiedlichen ethnischen Gruppen hin (z.B. Ashkenazi-Juden, Asiaten) (15).

1.1.3. Risikofaktoren

Familiäre Häufungen von CED wurden bereits in den 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts beobachtet und sind seither Gegenstand intensiver Forschung (9, 16, 17). Metaanalysen, die die Häufigkeit von Erkrankungen innerhalb erstgradiger Verwandter untersuchten sowie weiterführende Zwillingsstudien haben eine deutliche genetische Komponente des CED-Risikos aufgezeigt. Die Vererbung stellt somit den wichtigsten unabhängigen Risikofaktor beider Krankheitsentitäten der CED dar (18-20).

Allein die Genetik kann jedoch nicht den steilen Prävalenzanstieg erklären. Daher ist ein Zusammenhang mit bestimmten Lebens- und Umweltbedingungen der betroffenen Bevölkerungsgruppen nahe liegend (21-23).

Genetische Suszeptibilität

Mit Hilfe von *Positional Cloning* und *Genome wide association scans* (GWAS) konnten mehrere Krankheitsgene identifiziert und ein ätiologischer Zusammenhang mit CED hergestellt werden (24).

Ein immer wiederkehrender Locus liegt in der Region des *Major histocompatibility complex* (MHC) auf Chromosom 6. In übereinstimmenden Metaanalysen fanden sich genetische Veränderungen, die vermehrt in CED-Patienten gefunden werden (25, 26).

Das erste proklamierte singuläre Risikogen ist NOD2/CARD15, welches zur Familie der pattern recognition receptors (PRRs) gehört. Für dieses Gen sind mittlerweile

mehr als 30 Polymorphismen bekannt, die mit einer Erhöhung des relativen Erkrankungsrisikos einhergehen (27, 28). Weiterhin werden klassische pro-inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL-)1 β und Interleukin (IL-)6 und anti-inflammatorische vom Typ des Interleukin (IL-)10 mit CED in Beziehung gesetzt (29).

Diese exemplarisch aufgeführten Gene zeigen die heterogenen Grundlagen der Erkrankung zum Erstellungszeitpunkt dieser Arbeit (s. Tab. 1). Ihre Gemeinsamkeit ist die Einbindung in das Immunsystem und im Falle eines Gendefekts die Tendenz zu einer unkontrollierten chronischen Entzündungsreaktion.

In die Überlegungen über die Erkrankungen muss mit einbezogen werden, dass nicht alle Polymorphismen den gleichen Phänotyp erzeugen: einige lösen aggressivere Verläufe aus oder gehen mit besonderen klinischen Beobachtungen einher, während andere nur bei bestimmten ethnischen Gruppen pathologisch in Erscheinung treten. Ferner muss darauf hingewiesen werden, dass nicht alle Risikofaktoren in den diversen Studien verifiziert werden konnten.

Tab. 1: Ausgewählte Gene bzw. deren kodierte Proteine, die eine Schlüsselrolle in der Ätiologie von CED innehaben.

Protein	CED	Beteiligte Zellen	Funktion	Quellen
<i>Zytokine</i>				
IL-10	CD, UC	T _{reg} , B _{reg}	Anti-inflammatorisch	(29)
IL-12	CD, UC	Monozyten, Dendritische Zellen (DC)	Pro-inflammatorisch	(29)
IL-1 β	CD, UC	Monozyten	Pro-inflammatorisch	(30)
IL-6	CD, UC	Monozyten, DC, Th17	Pro-inflammatorisch	(31)
TNF- α	CD, UC	Monozyten	Pro-inflammatorisch	(30)
<i>„Barriereproteine“</i>				
AGR2	CD	Becherzelle	Mucus-Produktion	(32, 33)
ATG16L	CD	Epithelzellen	Autophagie	(34)
DLG5	CD, UC	Epithelzellen	Zellkontakt	(35)
DMBT1	CD	Epithelzellen	Bakterien-Bindung	(9, 36)
HLA II	UC	Alle Zellen	Antigenpräsentierendes Molekül	(37, 38)

IL23R	CD	Lymphozyten/ Makrophagen	proinflammatorische Signalkaskade	(39)
NELL1	CD	Lymphozyten	Signalvermittlung	(40)
NOD1	CD	Epithelzellen	Pattern recognition receptor (PRR)	(41)
NOD2	CD, UC	Monozyten, Epithelzellen, Lymphozyten	PRR	(27, 28)
Selektine/ Integrine	CD, UC	Endothelzellen, Neutrophile	Migration	(42, 43)
STAT3	CD	immun- kompetente Zellen	Anti-Apoptose, Zytokinproduktion, Zellreparatur	(44)
TLR1-4, 6	CD	Epithelzellen	PRR	(45)
Xbp1	CD, UC	Paneth-Zellen	Transkriptionsfaktor	(26, 46)
β -Defensin	CD, UC	Paneth-Zellen	Anti-mikrobielles Peptid	(47)

Lebens- und Umweltfaktoren

Wie zuvor bereits erläutert kann die genetische Prädisposition allein nicht den rapiden Anstieg an Neuerkrankungen erklären. Aus diesem Grund müssen weitere Faktoren in Betracht gezogen werden. Beispielsweise zeigen Menschen aus Ländern mit niedriger Prävalenz nach Migration in solche mit einer hohen Prävalenz bereits nach wenigen Jahren das gleiche Erkrankungsniveau wie die lokale Bevölkerung (48, 49). Dies verdeutlicht den Einfluss der Umwelt- und der Lebensumstände auf die Erkrankung. Vermutlich begünstigen Verhältnisse mit nahezu perfekten hygienischen Bedingungen eine mangelhafte Reifung des Immunsystems durch fehlende Antigenexposition. Einen Hinweis hierfür findet sich in der steigenden Inzidenz in Schwellen- und Dritte-Welt-Ländern, deren hygienische Standards in den letzten Jahren stetig steigen (50). Abwesenheit von fließendem warmem Wasser, Konsum nicht gewaschener Lebensmittel und das Aufwachsen in beengten häuslichen Verhältnissen scheinen hingegen protektiv auf die Krankheitsentstehung zu wirken (51-53). Hinzu kommen Lebensgewohnheiten wie Nikotinkonsum und kohlenhydrat- sowie fettreiche Ernährung, die die Exazerbationsrate und den Krankheitsverlauf der CED signifikant verschlechtern (54-56).

Frühgeburtlichkeit, Krankheit im ersten Lebensjahr und Appendektomie als unabhängige Risikofaktoren für Colitis ulcerosa werden ebenfalls diskutiert, konnten

jedoch nicht abschließend geklärt werden (57). Als Merkmale einer guten medizinischen Versorgung fügen sie sich in die o.g. „Hygiene-Hypothese“ gut ein.

1.2. Der Verdauungstrakt – Organ zwischen Toleranz und Abwehr

Der Verdauungstrakt des Menschen besitzt bei einer Länge von 7-8 m durch Faltung, Krypten und mikroskopische Zellausläufer (Mikrovilli) eine Oberfläche von 400-500 m². Er stellt damit die größte Grenzfläche des Körpers mit der Umwelt dar und bietet neben der physiologischen Funktion von Absorption der Nahrungsbestandteile eine potentielle Eingangspforte für bakterielle Zytoinvasion (58).

Aufgrund der hohen bakteriellen Dichte ist die Mukosa konstant einem externen und potentiell gefährlichen Stimulus ausgesetzt. Zur Erhaltung eines Gleichgewichts zwischen Toleranz und adäquater Abwehr ist ein fein tariertes Zusammenspiel von bakterieller Flora, Epithel und Immunsystem erforderlich.

1.2.1. Darmflora

Im Lumen des Verdauungstraktes befindet sich neben der dort prozessierten und gespeicherten Nahrung eine große Anzahl von Bakterien. Molekulare Analysen der mikrobiellen Zusammensetzung von fäkalen und mukosalen Proben zeigen eine Kolonisation durch 15.000 bis 36.000 unterschiedliche Spezies mit schätzungsweise 10^{13} - 10^{14} koloniebildenden Einheiten (59, 60).

Die unterschiedlichen Bakterien verteilen sich zu 99% in vier Hauptgruppen: Die beiden Familien der *Firmicutes* (u.a. Streptokokken, Clostridien) und *Bacteroides* (u.a. Lactobacillus) dominieren, während *Proteobacteria* und *Actinobacteria* eine untergeordnete Rolle spielen. Durch die enge Interaktion mit der Darmschleimhaut ist im Laufe des symbiotischen Miteinanders von Bakterien und menschlicher Darmschleimhaut ein einmaliges Ökosystem entstanden (61). Neben metabolischen Aufgaben haben die Bakterien auch Einfluss auf die Reifung und Funktion des Immunsystems. Daher hängt die Entwicklung einer funktionsfähigen Abwehrlage auch von der Zusammensetzung der Darmflora ab (62, 63). Unterstützt wird diese Annahme durch experimentell induzierte Colitiden an Mäusen, die in steriler Umgebung lebten: Sie entwickelten deutlich stärkere Darmentzündungen im

Vergleich zu konventionell lebenden Kontrolltieren (64). Analog zu diesen Experimenten werden Veränderungen der Darmflora in CED-Patienten vermehrt gefunden (65). Dieses Konzept steht im Einklang mit der bereits erwähnten „Hygiene-Hypothese“ im pathogenetischen Modell der CED. Diese Beobachtungen haben dazu geführt, dass Prä- und Probiotika in die Komplementärtherapie der CED eingeführt wurden (60, 66).

1.2.2. Kurzkettige Fettsäuren

Die Aufgabe der darmständigen Bakterien ist der Metabolismus von unverdaulichen Nahrungsbestandteilen wie komplexen Kohlenhydraten, abgeschilferten Epithelzellen oder Mukus. Etwa 20% der aufgenommenen Stärke in einer westlichen Ernährung gelangt so in den Dickdarm (67). Hauptmetabolit der anaeroben Bakterien sind kurzkettige Fettsäuren (KKFS, engl.: *short chain fatty acids*, SCFA) mit ein bis sechs Kohlenstoffatomen. Acetat (C₂), Propionat (C₃) und Butyrat (C₄) sind die häufigsten SCFA und liegen im Kolon in einem Verhältnis von 3:1:1 vor. Die Gesamtmenge an täglich produzierten SCFA beträgt 200-400 mmol. Als Nebenprodukte fallen Wasserstoff, Methan und Kohlendioxid an (68). Die Fettsäuren bilden damit den größten Teil der luminalen Anionen im Dickdarm. Das entstehende schwach saure Milieu führt zu einer Ionisierung der SCFA mit fehlendem Diffusionspotential. Erst durch Anionenaustausch oder spezifische Transporter gelangen sie in das portalvenöse Blut (69).

Butyrat dient als wichtiger Energieträger der Kolonepithelzellen, während Propionat in der Leber und Acetat überwiegend in peripheren Geweben wie der Muskulatur weitere Verwendung findet (70).

SCFA werden zudem entzündungshemmende Effekte zugesprochen (71). Butyrat ist ein sehr potenter negativer Regulator von NF-κB (72) und induziert eine Proliferationshemmung von Lymphozyten. Ähnlich wie Propionat unterdrückt es die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-2 und IL-6 (73, 74). Propionat unterhält des Weiteren die Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 und antagonisiert paradoxerweise einige Effekte des Butyrats (74). Außerdem wird allen SCFA die Induktion von antimikrobiellen Peptiden wie Cathelicidin/LL-37 zugesprochen (75).

Daneben können SCFA aber auch als chemotaktisch aktives Molekül agieren und über spezielle Rezeptoren, z.B. GPR43, wahrgenommen werden (s. Abschnitt 1.4.). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind Gegenstand der aktuellen Forschung und Thema dieser Dissertation.

Auch wenn die SCFA teilweise gegenteilige Effekte haben, ist eine balancierte Mischung der Fettsäuren insgesamt als protektiv hinsichtlich der Entwicklung von CED zu sehen und kann als komplementäre therapeutische Option empfohlen werden (z.B. Butyrat-Einläufe, ballaststoffreiche Kost) (76, 77). Darüber hinaus scheinen SCFA auch einen protektiven Einfluss auf die Entstehung von Kolonkarzinomen zu haben, die möglicherweise auch mit dem hier untersuchten Rezeptor GPR43 in Verbindung gebracht werden können (78).

1.2.3. Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase

Die intestinale Barriere zwischen Körper und Umwelt ist ein mehrdimensionaler Mechanismus. Hierzu gehört neben einer korrekten Reifung des Immunsystems eine physikalische Form der Abwehr. Hierzu gehört ein von epithelständigen Becherzellen gebildeter muzzinhaltiger Schleim. Er verhindert als physikalische Barriere und mit Hilfe von hierin gelösten antimikrobiellen Peptiden das Eindringen von Bakterien. Bei Darmentzündungen wird ein vermehrter Untergang von Becherzellen beobachtet (79, 80).

Ergänzt wird diese physikalische Barriere aus einem intakten und funktionsfähigen Epithel. Eine wichtige Komponente stellen Zell-Zell-Verbindungen dar, die den Körper nach außen „versiegeln“. *Tight junction* Proteine wie ZO-1, -2, Occludin oder Claudin regulieren die Diffusionskapazität für lösliche Stoffe und Flüssigkeiten vom Lumen in das Blut (81-83). Des Weiteren sind Adhärenz-Proteine (z.B. Cadherin-Catenin-Komplexe) an der Polarisierung und Regeneration der Epithelschicht beteiligt (84). Bei CED-Patienten sind Veränderungen in der Struktur und Menge dieser Proteine beschrieben, resultierend in einer erhöhten transepithelialen Diffusionskapazität (85).

In der Kommunikation zwischen Epithel und Effektorzellen des Immunsystems spielt die Expression und Sekretion von Zytokinen eine bedeutende Rolle. Verantwortlich für die Detektion von bakteriellen Bestandteilen sind phylogenetisch stark konservierte *Pattern-recognition-Rezeptoren* (PRR). Die beiden wichtigsten Familien

stellen die membranständigen *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) und die intrazellulär gelegenen *NOD-like-Rezeptoren* (NLR) von Epithelzellen und z.T. immunkompetenten Zellen dar (86-88). Bei Kontakt mit Antigenen leiten sie eine Kaskade ein, die in der Expression von pro- oder anti-inflammatorischen Zytokinen endet. NF- κ B, *Myeloid differentiation primary response gene* (MyD88), AKT/Phosphatidylinositol (PI)-3-Kinase und *Mitogen-activated Proteinkinasen* (MAPK) sind wichtige Vermittler dieser Abläufe. Sie werden durch inhibitorische Proteine in ihrer Funktion gehemmt, so dass ohne Stimulus keine entzündliche Aktivität resultiert (89). Über die Sekretion von Chemokinen werden phagozytierende neutrophile Granulozyten aus dem Blutgefäßsystem rekrutiert und die Regenerationsfähigkeit des Epithels verbessert (90).

Die Sekretion von Zytokinen wirkt sich auch auf die bindegewebsständigen Zellen, insbesondere auf T-Zellen und Makrophagen aus. Lebenslange Exposition durch Bakterien steigert die Toleranz der angeborenen und adaptiven Immunreaktionen und ermöglicht erst so ein kommensales Nebeneinander von Darmflora und körpereigenen Zellen ohne das fatale Ereignis einer chronischen Entzündung. Beispielsweise sind TLRs und CD4-Rezeptoren auf Makrophagen der Mukosa in geringerem Maße exprimiert und vermeiden so eine übersteigerte Immunantwort (91). Daneben wird vermehrt IL-10 von dendritischen Zellen sezerniert und trägt so zu einer protektiven Immunlage bei (92). Auch die Sekretion von Immunglobulinen unterliegt einer feinen Steuerung durch die interagierenden Partner der Mukosa: Hierbei findet sich transepithelial sezerniertes IgA vermehrt im Mukus (86, 87).

Weist dieses feine Gleichgewicht einen Defekt auf, so wird das System anfällig für entzündliche Vorgänge. In der Pathogenese der CED kann ein Übergewicht zugunsten der pro-inflammatorischen Signalwege beobachtet (5, 87) und höhere Level an entsprechenden Zytokinen gemessen werden (z.B. TNF- α , IL-1 β , IL-6) (93). Eine besondere Rolle spielen neutrophile Granulozyten, die neben der bakteriellen Phagozytose große Mengen TNF- α produzieren (30).

1.3. Neutrophile Granulozyten

Die zellulären Hauptbestandteile der angeborenen, nicht-adaptiven Abwehr des Körpers stellen das Makrophagen-Monozyten-System und die Granulozyten dar. Die Subpopulation der neutrophilen Granulozyten geht aus den myeloiden Stammzellen

im Knochenmark unter Einfluss unterschiedlichster Wachstumsfaktoren hervor. Dazu durchlaufen sie viele Zwischenstadien, so dass ihre Reifungsdauer in etwa 14 Tage beträgt. Pro Tag entstehen ca. 10^8 - 10^{11} Zellen. Der Kern eines reifen neutrophilen Granulozyten ist in 3-4 Segmente unterteilt und wird daher auch als polymorphkernig (eng.: *polymorphnuclear*; Abk.: PMN) bezeichnet. Außerdem enthält das Zytoplasma eine Vielzahl unterschiedlicher Granula, die sich in azurophile mit lysosomenartigen Eigenschaften (enthalten u.a. Myeloperoxidase) und spezifische Granula mit verdauenden Enzymen unterteilen. Neutrophile Granulozyten gelangen durch ihre schnellen Wanderungseigenschaften als erste Zellen an den Ort einer Entzündung. Dort können sie opsonisierte Bakterien phagozytieren und intrazellulär verdauen. Durch autolytische Prozesse und Apoptose gehen viele der Zellen am Ort des Geschehens unter und bilden den für Entzündungen charakteristischen Eiter (58).

1.3.1. Chemotaxis und Interleukin (IL)-8

Die gerichtete Bewegung von Zellen zu einem chemotaktisch aktiven Stimulus wird als Chemotaxis bezeichnet. Der Gradient dieses Stimulus zeigt das Konzentrationsgefälle zwischen zwei Orten an. Erst die Registrierung von unterschiedlichen Konzentrationen ermöglicht es der Zelle, sich richtungsorientiert zu bewegen (94, 95).

Als Stimuli wurden bisher mehr als 70 Chemokine (*chemotaktische Zytokine*) identifiziert, denen inflammatorische oder homöostatische Funktionen zugeordnet werden können (96). Daneben sind auch andere Stoffe, z.B. SCFA, am Migrationsprozess beteiligt (10, 97). Inflammatorische Chemokine werden von Zellen der Abwehr aber auch von Endothel- oder Bindegewebszellen sezerniert und zeigen den Ort einer Entzündung an (98). Diese Liganden werden auf der Zelloberfläche durch Rezeptoren vom G-Protein-gekoppelten (GPR) Typ wahrgenommen (99).

Eines der für neutrophile Granulozyten am stärksten chemotaktisch wirksamen Moleküle ist Interleukin 8 (IL-8, CXCL-8). Es wird es sowohl von neutrophilen Granulozyten selbst als auch von Monozyten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten produziert. Die Bindung an membranständige Rezeptoren aktiviert mehrere Mechanismen, die die gerichtete Migration möglich machen. Zusätzlich initiiert es Abwehrprozesse, u.a. *respiratory burst* und Freisetzung lysosomaler Enzyme (100). Krankheitsrelevante Verbindungen konnten

sowohl zu CED (101) als auch zur chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) hergestellt werden (102).

Für die vorliegende Arbeit sei darauf hingewiesen, dass in der wissenschaftlichen Nomenklatur für Nagetiere kein IL-8 existiert. Stattdessen wird sich auf *cytokin-induced neutrophil chemoattractants* (CINC) bezogen, deren IL-8-Korrelat in Mäusen der *keratinocyte-derived chemoattractant* (KC) darstellt (103).

1.3.2. Migration

Die eigentliche Migration von neutrophilen Granulozyten durch das Endothel der postkapillären Venolen in das umgebende Bindegewebe ist ein zeitlich genau gesteuerter, hierarchisch ablaufender Prozess. Er erfordert Konformationsänderungen auf mechanischer, molekularer und chemischer Ebene.

Die Extravasation ist in einem mehrstufigen Ablauf koordiniert. (1) Zunächst werden die Zellen in ihrer Geschwindigkeit des Blutflusses durch die reversible Bindung von Selektinen verlangsamt und aus der Mitte des Blutstroms an den Rand geleitet und abgebremst (*Margination*), um (2) anschließend niedrig-affine Bindungen einzugehen und ins sog. „*Rollen*“ zu gelangen. Im Verlauf (3) bilden sich höhergradig-affine Bindungen („*Arrest*“) mit dem Endothel aus. (4) Im Verlauf werden schließlich die Zell-Zell-Verbindungen gelöst, die zur Wanderung aus dem Gefäßbett erforderlich sind.

Bei diesem Ablauf spielen eine Vielzahl von Transmembranmolekülen eine wichtige Rolle. Ihnen gemeinsam ist, dass sie alle an der Bindungsarbeit beteiligt sind und zugleich Signale in das Innere der Zelle senden können, um einen Bereitschaftszustand zu initiieren (104). Besonders wichtig erscheinen im Kontext dieser Arbeit:

L-Selektin (CD62L) ist unmittelbar am „*Rollen*“ und der Zellaktivierung beteiligt. Es wird auf allen Leukozyten exprimiert und bindet Sialyl-Reste der Endothelmembranen. Über das *TNF- α -converting enzyme* (TACE/ADAM-17) und möglicherweise weitere Schnitt-Moleküle sowie Calmodulin-assoziierte Kaskaden wird die extrazelluläre Domäne proteolytisch abgespalten (sog. „*shedding*“) (105-108). Nach Verlust dieses molekularen Ankers kann die Zelle aus dem Gefäßsystem auswandern. Die Aktivierung wird intrazellulär auf die Proteinkinasen *p38*, *ERK1/2*, *Ras* und *Rac* fortgeleitet (109-111).

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPR) werden konstitutiv auf neutrophilen Granulozyten exprimiert und durch eine Reihe von Chemokinen aktiviert. Hierzu zählen Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), Komplementfaktor C5a, *Platelet-activating factor* (PAF), Leukotrien B4 sowie die Chemokine CXCL1-8 (u.a. IL-8) (104). Der Rezeptor reagiert mit einer Dissoziation seiner beiden Untereinheiten, dem α - und $\beta\gamma$ -Komplex (112). Der α -Komplex beinhaltet ein Molekül Guanosintrisphosphat (GTP) und inhibiert die Adenylatzyklase. Der $\beta\gamma$ -Komplex aktiviert die PI3-Phosphatkinase (PI3K) oder die Phospholipase C (PLC). Über eine Kaskade wird bei PLC-Ansprechen die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, deren unterschiedliche Isoformen zytotoxische Effektoraufgaben wie z.B. O_2^- -Produktion anregen. Die PLC hat des Weiteren einen Einfluss auf den Übergang vom „*Rollen*“ zur „*Arrest*“-Phase sowie an der Produktionssteigerung von Integrinen und deren Affinität. Zusätzlich werden Ca^{2+} -Speicher entleert, welches für die Motilität benötigt wird. Bei Aktivierung der PI3K wird die Proteinkinase B (PKB) aktiviert und in die Podien der migrierenden Zelle transportiert. Dort unterstützt sie die post-adhäsive Kontaktausbildung und O_2^- -Bildung. Zusätzlich können von der PI3K kleinmolekulige G-Proteine aktiviert werden, die am „*respiratory burst*“ beteiligt sind (104). Als funktionelle Konsequenz der eingegangenen Signale entstehen aktivierte neutrophile Granulozyten, die aus dem Gefäßbett herauswandern. Dort können sie körperfremde Partikel phagozytieren und verdauen. Durch ihre besondere Fähigkeit zur Superoxidradikalproduktion und Herstellung von verdauenden Enzymen in Kombination mit den guten Wanderungseigenschaften stellen die neutrophilen Granulozyten eine effektive Abwehr gegen Bakterien dar.

1.4. Der SCFA-Rezeptor GPR43 und seine Rolle in CED

Nilsson et al. beschrieben 2003 erstmals den einst als „Waisen-Rezeptor“ geltenden G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPR) 43 als sensibel für SCFA (113). Die geklonte murine wie auch humane Variante reagierte in einem Reporter-Cell-Assay auf die Stimulation mit Format (C_1), Acetat (C_2), Propionat (C_3) und Butyrat (C_4) in dosisabhängiger Weise (10, 11).

Vergleichende Untersuchungen der Aminosäure-Sequenz ergaben, dass eine 85%-ige Homologie zwischen Mensch und Maus vorliegt. Eine hohe Konservierung kann

als möglicher Hinweis auf eine wichtige, evolutionär unveränderte Funktion der Interaktion von Fettsäuren und Körperzellen gelten (113).

Außerdem zeigten schwedische Wissenschaftler, dass der Rezeptor durch Pertussis Toxin (PTX) selektiv gehemmt werden kann (113). Damit lässt sich GPR43 in die Gruppe der $G_{i/o}$ -Familie einordnen (114). Yonezawa et al. untersuchten humane Brustkrebszelllinien nach Stimulation mit Propionat und anderen SCFAs. Sie konnten zeigen, dass über GPR43 selektiv die Proteinkinase p38 und auch das Hitzeschockprotein (Hsp)27 phosphoryliert werden (115).

Der Rezeptor wird selektiv auf PMNs exprimiert und im Zusammenhang mit der SCFA-Sensor-Funktion kann daher eine wichtige Rolle an der Migration von PMNs vermutet werden (10, 11). Tatsächlich konnten Lepoul et al. *in vitro* in der Boyden-Kammer ein dosisabhängiges Wanderungsverhalten in Bezug auf unterschiedliche Stimuli zeigen (10). Vinolo et al. konnten 2009 *in vitro* und *in vivo* eine SCFA-abhängige Migration von neutrophilen Granulozyten in entzündliche Gewebe beweisen, die mit einer Aktivierung der Zellen einherging (97).

Eigene unveröffentlichte Untersuchungen, die dieser Dissertation vorausgingen, zeigten in quantitativen real-time-PCR-Experimenten die spezifische *GPR43*-Expression bei CED-Patienten. Entzündete Bereiche aus Kolonproben der Mukosa von CD- und UC-Patienten wiesen eine 3- bzw. 4,2-fach erhöhte *GPR43*-Expression auf. Histologische Untersuchungen zeigten ein korrelierendes Bild: Bei den entzündeten Proben von CD- und UC-Patienten fand sich eine bedeutend höhere PMN-Infiltration, während die nicht-entzündeten Bereiche weder Infiltrate noch Epithelschäden aufwiesen.

Im Zusammenhang mit den oben erwähnten Beobachtungen spricht dies für eine Beteiligung des Rezeptors an der immunologischen Reaktion des Darmes bei entzündlichen Prozessen.

1.5. Fragestellung

Da Chemotaxis-induzierende Effekte von SCFA bisher nur *in vitro* gezeigt werden konnten, soll in dem uns vorliegenden *Gpr43*^{-/-}-Mausmodell der Frage nachgegangen werden, ob *Gpr43* auch *in vivo* einen Einfluss auf die Funktion von neutrophilen Granulozyten besitzt. Dafür werden in den *Gpr43*-Knockout-Mäusen experimentelle Colitiden mittels Natriumdextransulfat (DSS) in unterschiedlichen Schweregraden durchgeführt. Im Anschluss und unter Einbeziehung der tierexperimentell gewonnenen Daten wird die Migrationsfähigkeit der *Gpr43*^{-/-}-PMNs *ex vivo* untersucht.

Folgende Fragen bilden den Ausgangspunkt der Arbeit:

- Welches klinische Bild zeigen *Gpr43*^{-/-}-Mäuse im Zuge einer akuten und chronischen DSS-Colitis?
- Weisen *Gpr43*^{-/-}-PMNs eine geringere Aktivierung und ein vermindertes Migrationsverhalten auf?
- Welche molekularen Erklärungsmodelle können für einen möglichen *Gpr43*-abhängigen Phänotyp herangezogen werden?

2. Methoden

2.1. *Materialien*

Die verwendeten Materialien sind tabellarisch im Anhang zu finden.

2.2. *Mäuse*

Alle verwendeten Tiere wurden gemäß den Tierhaltungsvorschriften im Kleintierstall der Christian-Albrechts-Universität (CAU) Kiel untergebracht, lebten in einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus und erhielten eine Standarddiät sowie Wasser *ad libitum*.

Die *Gpr43*^{-/-}-Mäuse stammen aus der Tierhaltung und -zucht der Firma Boehringer Ingelheim und wurden in einer Kooperation mit der Firma Lexington Pharmaceuticals generiert. Für sämtliche Experimente wurden die Mäuse über mindestens 10 Generationen auf den C57BL/6-Hintergrund zurückgekreuzt. Die erfolgreiche Gendelektion wurde via Western Blot auf Proteinebene und PCR auf RNA-Ebene von Proben aus den Schwanzspitzen überprüft. In den Experimenten wurden homozygote KO- und Wildtypmäuse in einem ausgewogenen Geschlechterverhältnis verwendet. Für koloskopische Untersuchungen und für die Tötung mittels zervikaler Dislokation wurden die Tiere mit Ketanest® anästhesiert.

Alle tierexperimentellen Versuche wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen der CAU Kiel durchgeführt (V 362-72241.121-33 (63-7/05)).

2.3. *DSS-Colitis*

Die Zerstörung der epithelialen Barriere im Darmlumen von Mäusen kann durch das Polymer Natriumdextransulfat (Dextransodiumsulfat, DSS) erreicht werden. Es wirkt direkt toxisch auf die Basalzellen in den Krypten der Kolonmukosa und wird von Makrophagen aufgenommen. Hieraus resultiert ein dauerhaftes entzündliches Geschehen (116).

In hoher Konzentration gegeben, induziert Natriumdextransulfat reproduzierbar Colitiden mit schweren Diarrhöen, Ulzerationen und Granulozyteninfiltration, die

hauptsächlich in den transversalen und distalen Bereichen des Kolons auftreten (117).

In niedriger und zyklusartig gegebener Konzentration resultiert ein chronisch-entzündliches Geschehen (117-119). Die beobachteten Resultate sind dem Entzündungsgeschehen im Menschen sehr ähnlich und eignen sich daher gut als Modell zur Untersuchung für die Fragestellung.

2.3.1. Induktion einer Colitis mit Natriumdextransulfat (DSS)

Zur Induktion einer akuten Colitis wurde den Mäusen über sechs Tage 4% w/v DSS (MW: 40kDa) in das Trinkwasser gemischt. Dieser Phase folgte ein 4-tägiger Beobachtungszeitraum ohne DSS-Gabe.

Im chronischen Modell erhielten die Mäuse über fünf Tage 2% w/v DSS (MW: 40kDa) gefolgt von einem ebenfalls fünftägigen Intervall mit Trinkwasser ohne DSS. Insgesamt wurde dieser Zyklus dreimal wiederholt, so dass eine Gesamtdauer von 30 Tagen resultierte.

In beiden Modellen wurde ein klinisches Monitoring durchgeführt (DAI) und anschließend koloskopische und histologische Untersuchungen sowie Entzündungsparameter erhoben.

Die Kontrolltiere erhielten über die gleiche Zeit Wasser *ad libitum*. Alle Kohorten erhielten die Standard-Trockenfutter-Diät des Tierstalls. Am Ende des Versuches wurden die Tiere koloskopiert, anschließend getötet und das Gewebe aufgearbeitet. Pro Kohorte wurde ein gemischtes Geschlechterverhältnis angestrebt (n=5 pro Geschlecht, s. Tab. 2), die Tiere stammten aus zeitnahe Würfen, so dass sie beim Beginn der Studienphase 21 ± 2 Tage alt waren und ein vergleichbares Gewicht aufwiesen (ca. 14 g).

Tab. 2: Verteilung der Kohorten.

	+ 4% DSS	H ₂ O <i>ad lib.</i>
Gpr43 ^{-/-}	5 Männchen 5 Weibchen	5 Männchen 5 Weibchen
Wildtyp	5 Männchen 5 Weibchen	5 Männchen 5 Weibchen

2.4. Klinischer Index (Disease Activity Index, DAI)

In der humanmedizinischen Forschung gibt es eine Vielzahl von gut validierten Indizes mit dem Ziel der quantitativen Erfassung der Erkrankungsaktivität von CED (120). Für die Beurteilung der Mäuse wurde der DAI angepasst. Außerdem wurden unterschiedlich viele Punkte für die vorher definierten Parameter „Gewichtabnahme in Prozent“, „Konsistenz“ und „rektale Blutung“ verteilt. Anschließend wurden diese Werte pro Tag und Maus ermittelt, addiert und der Mittelwert gebildet (s. Tab. 3) (121).

Tab. 3: Disease Activity Index (DAI).

Punkte	Gewichtabnahme (%)	Stuhlkonsistenz	Rektale Blutung
4	>20	klebt am Anus	Inspektion: positiv
3	11-20		
2	6-10	schmierig	Hämoccult: positiv Inspektion: negativ
1	1-6		
0	0	normal geformt	Hämoccult: negativ Inspektion: negativ

2.5. Koloskopie

Vor Beginn der Experimente (Tag 0) sowie an den Tagen 6 (akutes DSS-Modell) und 30 (chronisches DSS-Modell) wurden Koloskopien an den Mäusen durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die Mäuse mit Ketanest® anästhesiert und narkotisiert. Der Anus wurde befeuchtet und anschließend das starre Koloskop (HOPKINS® Optik

Tab. 4: Endoskopischer Index.

	Gefäß-muster	Stuhl-konsistenz	Verdickung der Kolonmukosa	Fibrin-beläge	Oberflächen-granularität
3	Blutungen	flüssig	intransparent	extrem	extrem
2	nicht sichtbar	ungeformt	stark	stark	stark
1	verstrichen	leicht geformt	moderat	moderat	moderat
0	normal	fest	transparent	keine	keine

64019BA; KARL STORZ AIDA™ VET) rektal eingeführt. Bei 80% Helligkeit wurde in den Mäusedarm so viel CO₂ insuffliert, dass dieser dilatiert und gut einsehbar war. Unter Zurückziehen der Optik wurde ein 30 sekündiges hochauflösendes Video gespeichert und anschließend ausgewertet, indem exemplarisch und repräsentativ Einzelbilder zur Dokumentation ausgewählt wurden.

Zur Objektivierung wurde ein adaptierter endoskopischer Index aus der Humanmedizin verwendet. Wesentliche Kriterien waren Gefäßmuster, Stuhlkonsistenz, Fibrinbeläge und Granularität der Oberfläche (s. Tab. 4) (120, 122). Die Punktwerte für die gewählten Parameter wurden addiert und anschließend in Mittelwerte umgerechnet.

2.6. Mäusepräparation

Am Ende des Versuches (Tag 10 bzw. bei Tod im akuten DSS-Modell; Tag 30 im chronischen DSS-Modell) wurden den Mäusen aller Kohorten Organe zur weiteren Untersuchung entnommen. Durch einen Mediansagittalschnitt wurde das Fell und die Körperfazie nach Desinfektion eröffnet und die Bauchmuskulatur durchtrennt. Diese Prozeduren geschahen unter Ketanest®-Narkose und nachfolgender zervikaler Disklokation.

Für die Blutentnahme wurde der Thorax parasternal eröffnet und mittels einer 22G-Braunüle und 5-ml-Spritze Blut intrakardial entnommen. Das Blut wurde in ein Röhrchen mit Serumkügelchen überführt und gut durchmischt. Die Zentrifugation erfolgte für 10 min. bei 3800 Upm. Anschließend wurde nur das Serum weiterverwendet.

Aus Leber und Milz wurden kleine ca. 30 mg schwere Stücke entfernt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in DNA- oder proteinbiochemischen Untersuchungen eingesetzt. Zur Gewinnung von Splenozyten wurde die Milz in RPMI-Lösung zerkleinert und daraus eine Zellsuspension erstellt. Nach Entfernen der Milzhülle wurden die Zellen über mehrere Zentrifugationsschritte (5 min., 3800 Upm) aufgereinigt und anschließend der FACS-Untersuchung zugeführt.

Das Intestinum wurde ab dem Magen mobilisiert und *in toto* entnommen. Stuhlreste wurden entfernt und der Darm mit PBS und darin gelöstem Penicillin und Streptomycin gespült. Nach der Längenbestimmung des Kolons wurden kleine

Stücke aus dem Kolon entnommen und in Plastikröhrchen überführt. Anschließend wurden sie für histopathologische und immunhistochemische Analysen in 4%igem PFA fixiert (s. Abschnitt 2.7.).

Darmabschnitte für die Kolonkulturen und MPO-Aktivitätsmessung wurden der Länge nach aufgeschnitten und als ca. 1 cm² große Stücke in RPMI gelagert. Zur weiteren Verwendung wurde gemäß Abschnitt 2.8. verfahren.

2.7. Histopathologische und immunhistologische Analyse von Kolonschnitten

2.7.1. Vorbereitung

Die Organe wurden wie in Abschnitt 2.6. beschrieben entnommen und in 4% bzw. 1% Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert, um die ursprüngliche Architektur des Gewebes zu erhalten. Die Organstücke wurden in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom in 4,5 µm dicke Scheiben geschnitten. Auf einen Objektträger transferiert, wurden sie luftgetrocknet und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (Xylolersatz 2x 10 min.; 100% Ethanol 2x 5 min.; 90% Ethanol 5 min.; 80% Ethanol 3 min.; 70% Ethanol 3 min.; 50% Ethanol 3 min.; Aqua dest. 5 min.) entparaffiniert.

2.7.2. Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Die Objektträger mit den Schnitten wurden 5 min. in Hämatoxylin (Roth) und Eosin (Roth) gefärbt. Anschließend wurden sie mit fließendem Leitungswasser für 10-15 min. gespült, um das überschüssige Farbsubstrat zu entfernen. Durch diese Färbung nahm das Zytoplasma eine rosa Farbe an, während Zellkerne blau-lila erschienen. Anschließend folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol 5 s.; 80% Ethanol 5 s.; 90% Ethanol 5 s.; 100% Ethanol 2x5 min.; Xylolersatz 3 min.) und das Eindeckeln mit einem xylofreien Eindeckmedium (Roth) und Deckglas.

2.7.3. *Histologischer Index*

Die präparierten Kolonabschnitte wurden in Paraffin eingebettet und, wie oben beschrieben, geschnitten und gefärbt. Die Präparate wurden verblindet nach histopathologischen Kriterien (Epithelschaden und Infiltration) beurteilt, pro Tag und Maus addiert und der Mittelwert gebildet (s. Tab. 5) (121).

Zur Quantifizierung der Infiltration von PMN in die Mukosa wurde der PMN-Infiltrations-Index gebildet. Er setzt sich aus der mittleren Anzahl von PMNs pro Augenfeld in drei verschiedenen Schnitten des distalen Kolons bei einer 600-fachen Vergrößerung zusammen.

Die Auswertung erfolgte an einem Axiomager Z1 Mikroskop, die Bilder wurden digital gespeichert.

Tab. 5: *Histologischer Index.*

Punkte	Epithelschaden	Infiltrat
4	flächenhafter Kryptenverlust	Infiltrat durch <i>Muscularis mucosae</i> bis in Submukosa
3	Kryptenverlust	mehr Infiltrat, mit Ödem
2	flächenhafter Verlust von Becherzellen	Infiltrat zwischen Krypten und <i>Muscularis mucosae</i>
1	Verlust einzelner Becherzellen	wenig, an der Kryptenbasis
0	normale Morphologie	keine Infiltrat

2.7.4. *Antikörperfärbung*

Zur Darstellung der p38-Aktivierung wurden ebenfalls Paraffinschnitte verwendet. Die Schnitte wurden mit einem Anti-phospho-p38-Antikörper (1:200 in PBS) für eine Stunde inkubiert und anschließend mit biotinyliertem Ziegen-IgG als Sekundärantikörper vernetzt. Daran folgte die Bindung an Avidin-HRP und anschließend die Detektion über das Chromogen Kit (Vector Laboratory, Burlingame, CA). Kontrollen wurden mit irrelevanten Antikörpern oder durch Färbung mit dem sekundären Antikörper durchgeführt. Analog zur im vorherigen Abschnitt

beschriebenen Auswertung erfolgte sie auch in diesem Fall an einem AxioImager Z1 Mikroskop. Die Bilder wurden auch hier digital gespeichert.

2.8. Immunchemische Methoden

2.8.1. Zytokin-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA dient der Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Suspensionen. Mittels einer Quervernetzung von spezifischen Antikörpern gegen ein gesuchtes Protein und einem Antikörper-gebundenen Enzym kann photometrisch im Vergleich mit einer Standardverdünnung auf die Konzentration rückgeschlossen werden.

Zur Gewinnung von Überständen aus den Gewebekulturen wurden die zuvor präparierten Abschnitte des Darmes in mit RPMI (versetzt mit Streptomycin und Penicillin) gefüllte Vertiefungen einer 32-Loch-Platte überführt und für 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Überstände wurden abgesaugt und zentrifugiert (5 min., 3800 Upm), um Zellüberreste zu entfernen. Der Überstand hiervon wurde in Plastikreaktionsgefäße überführt und im ELISA verwendet.

Die Kits für TNF- α und KC wurden kommerziell bezogen und gemäß Herstellerangaben verwendet. Tab. 12 im Anhang gibt Aufschluss über Hersteller und verwendete Kits. Als Proben wurden Kolonkultur-Überstände sowie Blutserum verwendet. Ein Standard aus hochaufgereinigtem Protein wurde in unterschiedlichen Verdünnungen hinzugefügt und diente sowohl als Kontrollreaktion als auch zur Umrechnung der unbekanntenen Probenkonzentrationen.

Vor der eigentlichen Versuchsansetzung wurden die Vertiefungen der Titerplatten mit 50 μ l verdünntem spezifischen *Capture*-Antikörper (1:125 in PBS) befüllt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie dreimal mit je 80 μ l Waschpuffer (0,1% Tween 20 in PBS) gewaschen und anschließend mit 100 μ l Blockingpuffer (1:200 Bovines Serumalbumin (BSA) in PBS) blockiert.

In einem nächsten Schritt wurden die Vertiefungen mit je 80 μ l Waschpuffer gewaschen und die Titerplatte mit je 80 μ l Proben oder Standardlösungen befüllt. Dieser Ansatz wurde für 2 Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

Nachfolgend wurde die Platte erneut gewaschen und mit 100 μ l *Detection*-Antikörper (1:250 in Waschpuffer) pro Vertiefung beschickt. Dieser Ansatz wurde ebenfalls für 2

Stunden inkubiert, bevor ein weiterer Waschschrift folgte. 50 µl der Extravidin-Peroxidase, gekoppelt an einen Antikörper (1:500 in Waschpuffer), wurden in die Vertiefungen gefüllt und für 45 min. inkubiert.

Nach einem weiteren Waschschrift und Zugabe von 50 µl TMB-Substrat wurde die Platte für wenige Minuten im Dunkeln inkubiert. 100 µl der Stop-Lösung beendeten die Peroxidasereaktion. Der Farbumschlag wurde bei 490 nm photometrisch bestimmt.

2.8.2. Myeloperoxidase (MPO)-Aktivitäts-Messung

Zur Messung der Myeloperoxidase (MPO) wurden entommene Kolonstücke homogenisiert und gemäß der Herstellerangaben des Kits (s. Tab. 12 im Anhang) weiterverwendet.

Analog zum ELISA-Protokoll werden auch hier die gesuchten Antigene mittels Antikörpern detektiert und anschließend durch eine photometrisch bestimmbare Lichtreaktion sichtbar gemacht.

2.8.3. L-Selektin-Quantifizierung durch Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Bei der FACS-Messung werden fluoreszierende Farbstoffe (z.B. FITC) durch einen Laserstrahl zum Leuchten angeregt und erlauben anschließend durch Messung der Fluoreszenz eine Quantifizierung der gebundenen Stoffe.

Die aus den Milzen gewonnenen Splenozyten wurden nach dreimaligem Waschen in PBS in Teilproben von ca. 5×10^5 Zellen in FACS-Puffer (PBS + 1% (w/v) BSA + 0.1% (w/v) Natriumazid) überführt und für 30 min. im Kühlschrank unter ständigem Rollen mit Antikörpern (FITC-gekoppelte L-Selektin-Antikörper (1:1000 in PBS) und Ly6G-Antikörper (1:500 in PBS)) inkubiert. Die Zellen wurden bis zur FACS-Messung kühl und dunkel gelagert. Nach Verwerfen der ersten 5.000 Zellen wurden jeweils mindestens 10.000 Zellen bei einer Flussgeschwindigkeit von 200-300 Zellen/s. mit dem FACS-Gerät (FACSCalibur®) gemessen.

Zur Berechnung des Expressionsgrades von L-Selektinen auf der Zelloberfläche wurde angenommen, dass sich auf unbehandelte Zellen eine 100%ige Expression nachweisen lässt. Verglichen wurden diese Werte mit PMA-behandelten Zellen.

Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) induziert eine PKC-abhängige Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen, so dass alle membranständigen L-Selektine abgetrennt werden (123). Die relative Expression für die fraglichen Zellen wurde aus der Relation zu diesen Werten ermittelt (124):

$$\text{rel. Expression} = \frac{\text{gemessene Expression}}{\text{Grund expression}}$$

2.9. Arbeiten mit DNA und RNA

2.9.1. RNA-Isolation, cDNA-Synthese und Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Gewebeproben wurden in Plastikröhrchen unter dauerhafter Kühlung in flüssigem Stickstoff mechanisch zerkleinert. Die Suspensionen aus Gewebetrümmern wurden dann in QIAshredder-Säulen zentrifugiert und die RNA anschließend mit dem Qiagen RNeasy Kit laut Herstellerangaben aus dem Durchfluss isoliert. Die RNA-Konzentration wurde mithilfe des Nanodrop-Systems ermittelt. Als interne Qualitätskontrolle wurden 5 µl RNA auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen und die 18S und 28S Banden analysiert. Zusätzlich wurde eine PCR mit Oligonukleotiden mit GAPDH zum Ausschluss genomischer DNA durchgeführt.

Aus der aufgereinigten RNA wurde mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase, RTase) komplementäre DNA (*complementary* DNA, cDNA) hergestellt. Hierzu wurden Oligo(dT)-Primer hinzugegeben, die an die Poly-A-Sequenzen der RNA hybridisierten und als Startpunkt für die RTase dienten.

Für die Reverse Transkription wurden 250 ng RNA genutzt und mit 1 µl Oligo(dT)-Primer und DEPC-Wasser auf ein Endvolumen von 13 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde in einem Cycler 2 min. bei 70°C erhitzt und anschließend mit dem in Tab. 6 angegebenen RTase-Ansatz gemischt.

Tab. 6: RT-PCR-Ansatz.

Reagenz	Menge/tube
5x Puffer	4 µl
dNTP	1 µl
RNase Inhibitor	1 µl
MMLV RTase	1 µl
	19 µl

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 42°C und anschließend 5 min. bei 95°C in einem Cycler inkubiert. Die cDNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop-System photometrisch ermittelt. Danach wurde die cDNA durch Zugabe von DEPC-Wasser auf eine Endkonzentration von 250 ng/µl equilibriert und zur Qualitätskontrolle einer RT-PCR mit GAPDH-Primern unterzogen. Zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) stellt eine effektive Methode dar, einen genau definierten Abschnitt DNA oder cDNA zu vervielfältigen (amplifizieren) (125). Essentiell für den Ablauf der Reaktion ist neben spezifischen Primern, einer Originalmatrize (*template*) und optimalen Pufferbedingungen das Enzym DNA-Polymerase (Taq-Polymerase, z.B. aus *Thermophilus aquaticus*). Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in Tab. 7 dargestellt. Die lyophilisierten Primer (*Gpr43*: Forward: 5'-GCG GTG GTG AAG AGC AGA CAG C-3', Reverse: 5'-CAG AGC AGC GAT CAC TCC ATA CAG TG-3', Annealing: 69°C; *β-Aktin*: Forward: 5'-ATC ATT GCT CTC CTG AGC G-3', Reverse: 5'-GCT GAT CCA CAT CTG GAA-3', Annealing: 60°C) wurden initial auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt und anschließend als Mix mit einer Konzentration von 10 µM eingestellt und verwendet.

Tab. 7: PCR-Ansatz

Reagenz	Menge/tube
cDNA template	2 µl
Primer-Mix	0,4 µl
dNTP	0,2 µl
GoTaq Polymerase	0,1 µl
5x Puffer	4 µl
DEPC-H ₂ O	13,3 µl
	20 µl

Das PCR-Programm ist in Tab. 8 dargestellt. Die optimale Zykluszahl für die Primer (25-30 Zyklen) wurde in Vorversuchen ermittelt. Im Anschluss wurde noch ein End-Elongations-Schritt von 5 min. eingefügt.

Tab. 8: *PCR-Programm*

Reaktion	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	05:00
Primer-Annealing	s. Text	00:30
Elongation	72°C	1:00 / kb

2.9.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von RT-PCR-Fragmenten unterschiedlicher Länge erfolgte in 1%igen Agarosegelen. Dazu wurde 1% Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, mit $2 \times 10^{-3}\%$ SybrSafe® versetzt und zu einem Gel gegossen. Nach dem Aushärten wurde es mit TAE-Puffer überschichtet. 18 µl des Gemisches wurden anschließend zusammen mit einem Ladepuffer aus der RT-PCR-Reaktion in die Geltaschen gefüllt. Als Standard wurden 5 µl SmartLadder in eine Kontroll-Tasche pipettiert. Danach wurde eine elektrische Spannung (5-10 V/cm Elektrodenabstand) zur Auftrennung der Fragmente angelegt. Nach 45 min. wurden die durch das SybrSafe® angefärbten DNA-Fragmente auf einem UV-Schirm sichtbar gemacht und dokumentiert. Eine quantitative Analyse wurde mit den Programmen ImageJ und Microsoft Excel durchgeführt.

2.10. Proteinbiochemische Methoden

2.10.1. Herstellung von Proteinlysaten

Gewebeproben wurden unter Stickstoffkühlung grob zerkleinert und mit 50-100 µl eiskaltem Lysepuffer 1x DLB sowie 1% Phosphatase Inhibitor Cocktail II mit 2% 50-

fach Protease Inhibitor Cocktail behandelt. Nach Aufkochen (99°C, 5 min.) und Ultraschallbehandlung (2x 5 s.) wurden die Zellrümpfer abzentrifugiert (16.000 xg, 15 min., 4°C). Der Überstand (= denaturiertes Zelllysate) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Biuret/Lowry (126). Die denaturierten Proteinlysate wurden bei -80°C gelagert.

2.10.2. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Zur Proteinauftrennung fand die Methode nach Laemmli Anwendung (127). Hierbei wurden die Proteine in einem niederprozentigen Acrylamidgel zusammengeführt und anschließend in einem höherprozentigen Acrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. 10 µg Protein wurden mit 0,2 Volumen 5x SDS-LB versetzt und anschließend für 3 min. bei 100°C erhitzt. Anschließend wurden 10 µg Probe und 5 µl Proteingrößenmarker (Dual-Color) in die Taschen des Gels aufgetragen. In einer mit SDS-Puffer gefüllten Elektrophorese-Kammer wurde die Proteinlösung im ersten Schritt bei 15 mA/Gel für 30 min. im Sammelgel zusammengeführt und nachfolgend bei 30 mA/Gel für 45-90 min. nach Molekülgröße aufgetrennt.

Die im Acrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden durch das Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen, um sie so der Proteinfärbung/Immunfärbung zugänglich zu machen.

Für die Elektrophorese wurde 1 PVDF-Membranen/Gel für 10 s. in Methanol aktiviert, anschließend für 5 min. in H₂O gewaschen und noch einmal für 5 min. in Anodenpuffer I und II getaucht. Je ein Filterpapier (Dicke: 3 mm) wurde in frischen Anoden- bzw. Kathodenpuffer eingeweicht.

Das von Kathodenpuffer getränkte Filterpapier wurde auf den Bereich des Trenngels gelegt, wo es als Schablone für die Entfernung aller übrigen Gelreste um den Bereich des Filterpapiers diente. Nach Umdrehen des Filterpapiers wurde der nun frei liegende Gelbereich blasenfrei mit der PVDF-Membran bedeckt. Auf die PVDF-Membran wurden zuerst das anodenpuffergetränkte Filterpapier gelegt. Der Proteintransfer erfolgte im Blotter bei 300 W, 0,8 mA/cm² für 60-90 min.

2.10.3. Immunodetektion

Alle Schritte der Immunodetektion fanden unter ständigem Rollen statt. Die Membran wurde zunächst für 10 min. in TTBS gewaschen und anschließend mit 3% Milchpulver in TTBS für 12 h inkubiert. Dieser Schritt dient der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Der Primärantikörper wurde auf die gewünschte Konzentration verdünnt, auf die Membran gegeben und im Kühlschrank über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TTBS für je 5 min. wurde der Sekundärantikörper hinzugefügt und für 30 min. inkubiert, danach wurde die Membran 3x 15 min. lang mit TTBS gewaschen.

Zur Detektion wurde das GE Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Kit verwendet und die Membran in einer Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm gelegt.

2.11. Chemotaxis-Messung

Für die Untersuchung des Migrationsverhaltens in Abhängigkeit von Gpr43 wurden isolierte PMNs in Chemotaxis-Experimenten untersucht.

2.11.1. Vorbereitungen

Zur Isolation von PMN für die Verwendung in den Chemotaxis-Experimenten wurde in *Gpr43*^{-/-}-Mäusen sowie in Wildtypmäusen Peritonitiden erzeugt und anschließend die Peritonealflüssigkeit aufgereinigt.

Den mit Ketanest® anästhesierten Mäusen wurden unter sterilen Bedingungen 2 ml Thioglycollat in die Bauchhöhle appliziert. Nach sechs Stunden wurden die Mäuse getötet und eine Peritoneallavage mit Hilfe einer Braunüle und 5 ml PBS durchgeführt. Die Lavagen der gleichen Kohorten (n=3) wurden in 15ml-Falcon-Röhrchen gesammelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation auf dem Boden des Röhrchens sedimentiert. Aus dem erneut gelösten Sediment wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt und die gewünschte Konzentration durch Hinzufügen von PBS eingestellt.

Durch Hämalaun-Färbung wurde die Zellpopulation in Vorversuchen charakterisiert und mehr als 95% PMN in den Lavagen gefunden.

2.11.2. Modifizierter Boyden-Kammer-Assay

In der von Stephen Boyden 1962 etablierten Chemotaxis-Kammer folgen migrationsfähige Zellen dem Gradienten eines Stimulus (128). Das hier verwendete System besteht in Anlehnung an die Originalkonstruktion aus zwei Plexiglaskammern, in welche Zellsuspensionen bzw. ein gelöster Stimulus eingefüllt werden können. Diese beiden Kompartimente sind durch eine PVP-Membran mit unterschiedlicher Porengröße getrennt, so dass nur eine gewisse Anzahl von „Durchgängen“ zur Verfügung steht. Die Porengröße des Filters von 8 µm wurde so gewählt, dass neutrophile Granulozyten (Durchmesser: 10-12 µm) nicht zufällig durch die Löcher fallen konnten, sondern aktiv wandern mussten.

1,5 ml des jeweiligen Stimulus (z.B. SCFA, KC) wurde in die untere Kammer appliziert. 1 ml der Zellsuspension wurde in die obere Kammer gegeben. Die Gesamtapparatur wurde für 60 min. bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen im unteren Kompartiment mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer quantifiziert.

Zur Quantifizierung wurde ein Chemotaxis-Index (CI) erstellt. Hierzu wurde der Quotient der Zellzahl aus den unteren Kammern, in denen kein Stimulus enthalten war, (Basismigration) und den Kammern, in denen ein spezifischer Stimulus (beobachtete Migration) enthalten war, gebildet. Der CI bildet die relative Chemotaxis in Richtung des spezifischen Reizes ab.

2.12. Statistik

Für die statistische Auswertung wurde Microsoft Excel 2008 für Macintosh verwendet. Es wurden Mittelwerte, Medianwerte, Standardabweichungen (SD) und der p-Wert bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1. **Charakterisierung des basalen Phänotyps von *Gpr43*^{-/-}-Mäusen**

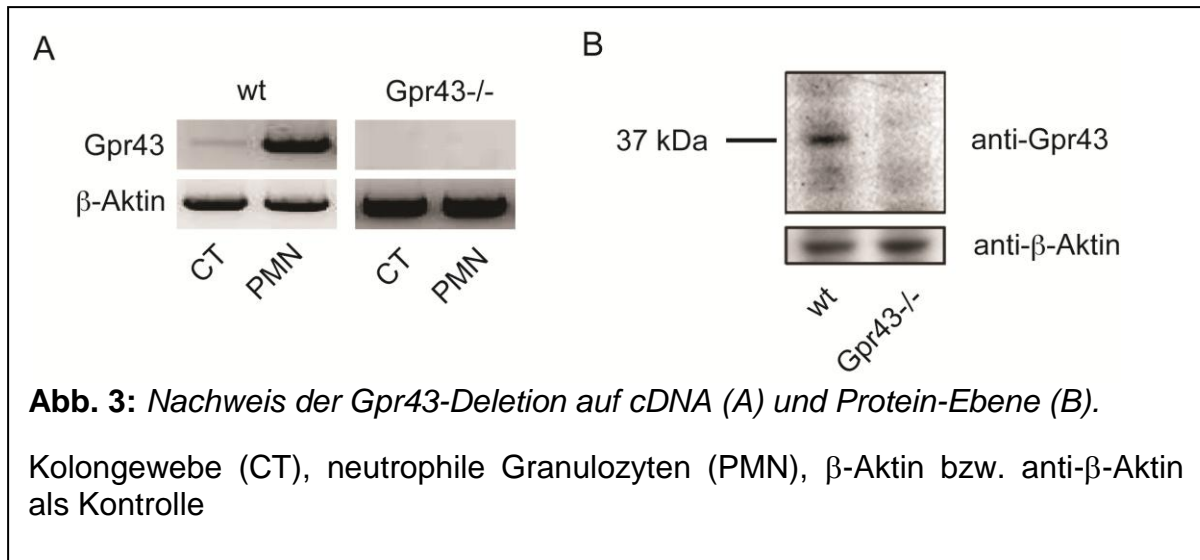
Die Tiere lebten in einem normalen 12-stündigen Hell-/ Dunkelzyklus und reagierten sowohl auf die Standardnahrung als auch das Trinkwasser ohne ersichtliche Symptome. Sowohl *Gpr43*^{-/-}-Mäuse als auch die Normalkontrollen zeigten ohne Zusatz im Trinkwasser weder eine spontane Entzündung des Dickdarmes oder spontan auftretende Tumoren noch andere pathologische Zeichen. Abgesichert wurden diese Beobachtungen durch endoskopische Untersuchungen und histologische Analyse der Därme.

Das Wachstum und die Gewichtsentwicklung der *Gpr43*^{-/-}-Mäuse war mit den Wildtypmäusen (*littermate* Kontrollen) vergleichbar (s. Abb. 2A).

Bei Koloskopien an unbehandelten Tieren zeigte sich eine rosige Oberfläche der Mukosa mit durchschimmernden Venenzeichnungen. Blutungen oder Ulzerationen wurden nicht festgestellt. Der Stuhl war von fester Konsistenz und kugelartig geformt. Die nach Tötung der Tiere entnommenen Därme wiesen eine mittlere Länge von 8,5 cm (SD: 0,4 cm) auf. Diese Länge ist in etwa vergleichbar mit denen von Wildtypmäusen.

Histologisch zeigte sich ein durchgängig geschlossenes Epithel ohne Anzeichen von Erosionen, Ulzerationen oder regenerativem Gewebe. Die Zellen waren palisadenförmig in den Krypten angeordnet und zeigten die typische Konfiguration mit einer hohen Anzahl von Becherzellen (s. Abb. 2B).

Auch auf Proteinebene wurde die Deletion nachgewiesen. Im Western Blot konnte kein entsprechendes Genprodukt in Kolongewebeproben detektiert werden. In Wildtypmäusen konnte hingegen ein positiver Befund erhoben werden. Zur Kontrolle eines gleichmäßigen Proteineinsatzes wurde β -Aktin detektiert, welches in beiden Proben in homogener Verteilung gefunden wurde (Abb. 3B).



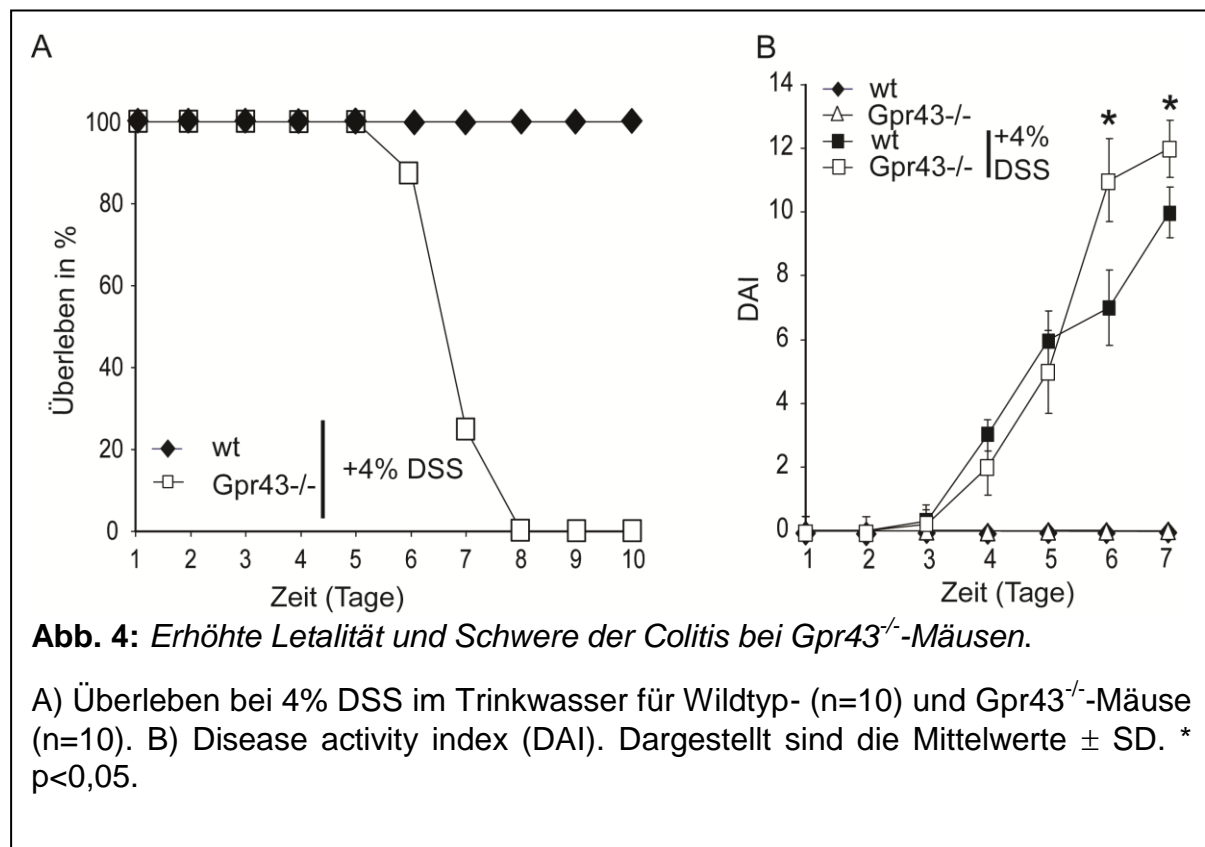
3.2. Akute Colitis

Wie im Methodenteil beschrieben wurde eine akute Colitis mit DSS in den Mäusen induziert. Zur Evaluation der Entzündung wurden klinischer Phänotyp, Koloskopie, Histologie und Zytokinwerte betrachtet und ausgewertet.

3.2.1. Phänotyp

Abb. 4A zeigt die Überlebensrate der DSS-behandelten Mäuse. Die Wildtypen unter DSS-Gabe überlebten zu 100%, ebenso die Kontrolltiere ohne DSS (Daten nicht gezeigt). Nach bereits 7 Tagen waren 80% der *Gpr43*^{-/-}-Mäuse und am achten Tag der Versuchsreihe 100% der Tiere dieser Kohorte gestorben.

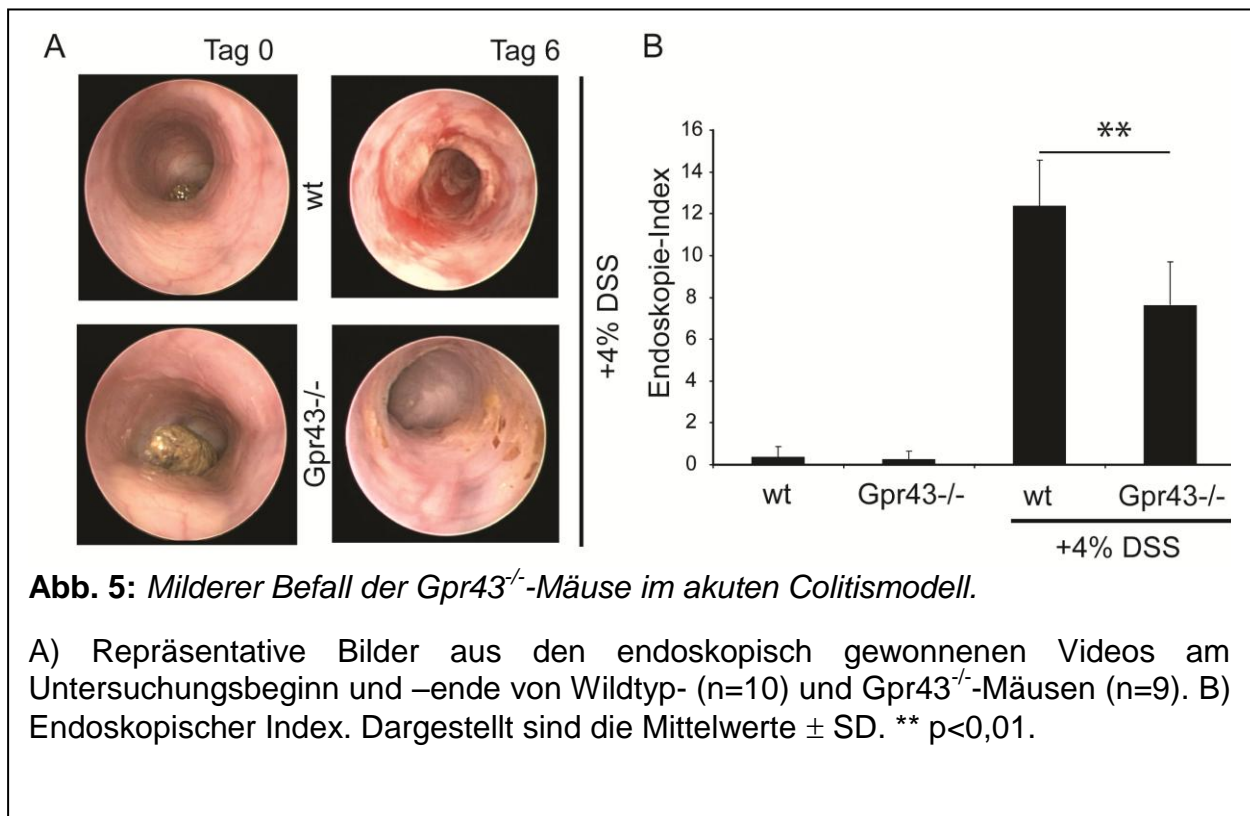
Abb. 4B zeigt die Ergebnisse des täglich aus Gewicht, Blutungsstärke und Stuhlkonsistenz kalkulierten DAI. Der Kurvenverlauf zeigt eine zwischen den Gruppen vergleichbare ansteigende Tendenz bis zum 5. Tag. Ab diesem Zeitpunkt zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Entzündungsstärke, der sich quantitativ in einem um 4 Punkte differierenden DAI äußerte. Am 7. Tag erreichten die *Gpr43*^{-/-}-Mäuse den höchsten DAI-Wert (12 Punkte) im abgebildeten Verlauf. Er unterschied



sich weiterhin signifikant von dem der Wildtypmäuse (10 Punkte). Die Kontrolltiere zeigten keine Verschlechterung ihres Zustandes.

Durch die Koloskopie am Ende der Versuchsreihe wurde die Stärke der Entzündung mit Hilfe des Endoskopie-Indexes evaluiert. Abb. 5A zeigt exemplarisch Fotos der Koloskopie, wie sie zur Erstellung des Indexes verwendet wurden. Am 6. Tag wurden in beiden Kohorten starke Zeichen der Entzündung festgestellt. Die Wildtypmäuse zeigten bedeutend größere Erosionen bzw. Ulzerationen, die in diesem Ausmaße in den *Gpr43*^{-/-}-Tieren nicht zu sehen waren. In den Därmen beider Kohortentiere wurden die mukosalen Venen kaum mehr gesehen und in beiden wurde stark verflüssigter Stuhl detektiert. Die Grafik illustriert die Veränderung in Form eines Balkendiagramms (s. Abb. 5B).

Insgesamt zeigte sich unter DSS-Gabe (Endoskopischer Index: $9 \pm 0,46$ vs $12,375 \pm 2,26$; $p=0,007$) ein signifikanter Unterschied zwischen *Gpr43*^{-/-}- und Wildtypmäusen, der die endoskopische gewonnene Einschätzung unterstützt, dass Wildtyp-Mäuse stärker von der DSS-Colitis betroffen waren.



Als weiterer Parameter wurde die Kolonlänge der Tiere am Ende der Versuchsreihe gemessen. Die Kontrolltiere zeigten keine Veränderungen in der Kolonlänge. In den

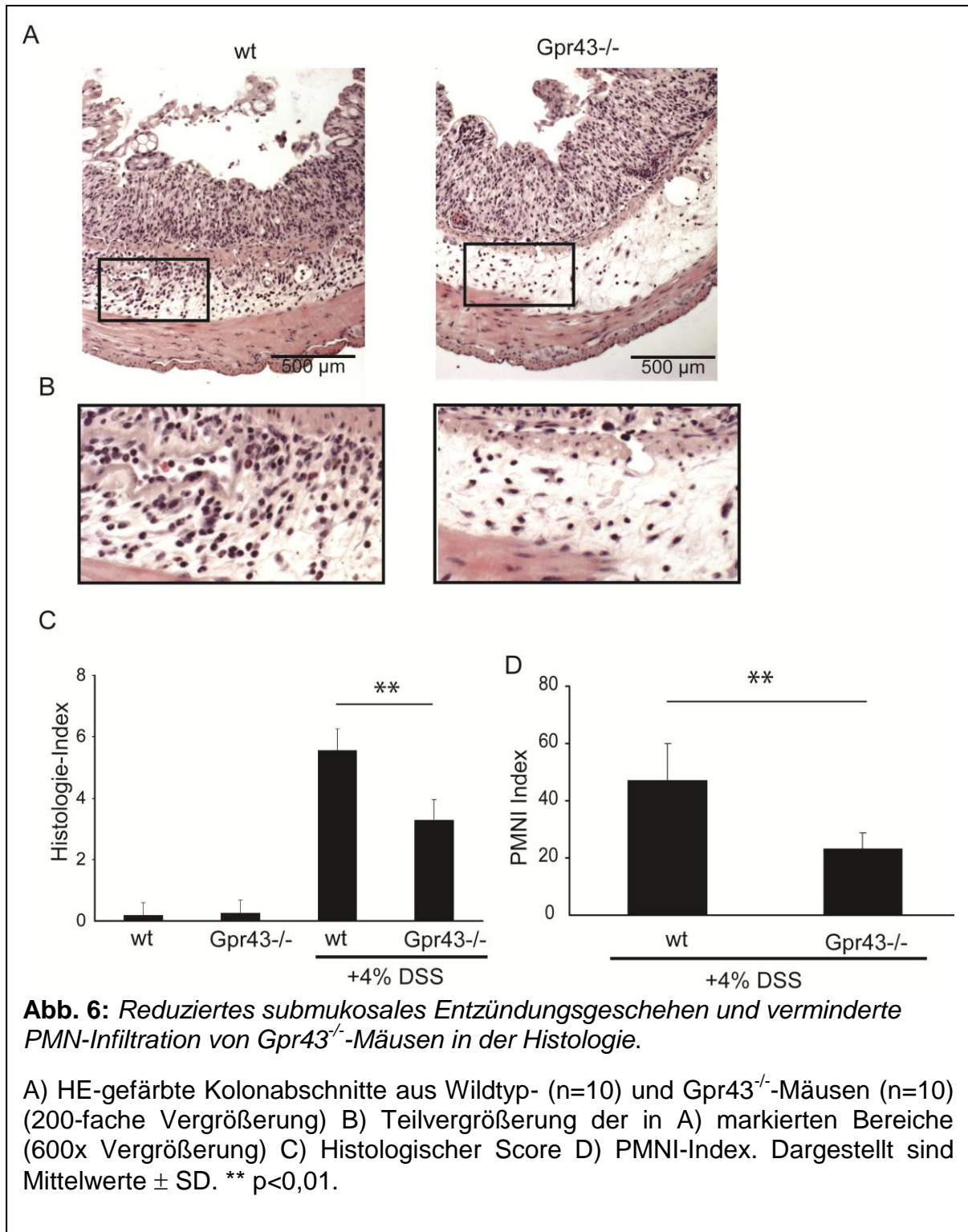
Gpr43^{-/-}-Mäusen konnten signifikant kürzere Därme als in den Wildtypmäusen nachgewiesen werden (6,2 cm vs 6,7 cm; p=0,009). Anzunehmende Ursache hierfür ist die ödematöse Schwellung des Darmgewebes, die zu einer Verkürzung führt und an den Grad der Entzündung gekoppelt ist.

3.2.2. Beurteilung der Infiltration von PMNs

Mit Hilfe des histologischen Indexes wurden die aufgearbeiteten und HE-gefärbten Biopsien aus den distalen Stücken des Kolons in ihrer Entzündungsschwere eingeschätzt.

In Abb. 6A sind exemplarische Schnitte, in 6B deren relevante Vergrößerungen, gezeigt, wie sie zur Auswertung vorlagen. Das Epithel der Wildtypmäuse fehlte nahezu komplett, Krypten und Becherzellen waren verschwunden, z.T. zeigte sich regeneratives Gewebe. Zusätzlich war die Submukosa stark von vielen Makrophagen sowie einigen Lymphozyten und Granulozyten besiedelt. Die Veränderungen der Mukosa in *Gpr43*^{-/-}-Mäusen war deutlich zu erkennen. Bewertet nach den Kriterien des histologischen Indexes (Abb. 6C) liegt eine signifikant stärkere Entzündung bei den Wildtypmäusen als bei den *Gpr43*^{-/-}-Mäusen vor ($5,56 \pm 0,62$ vs $4,25 \pm 0,96$; p<0,01).

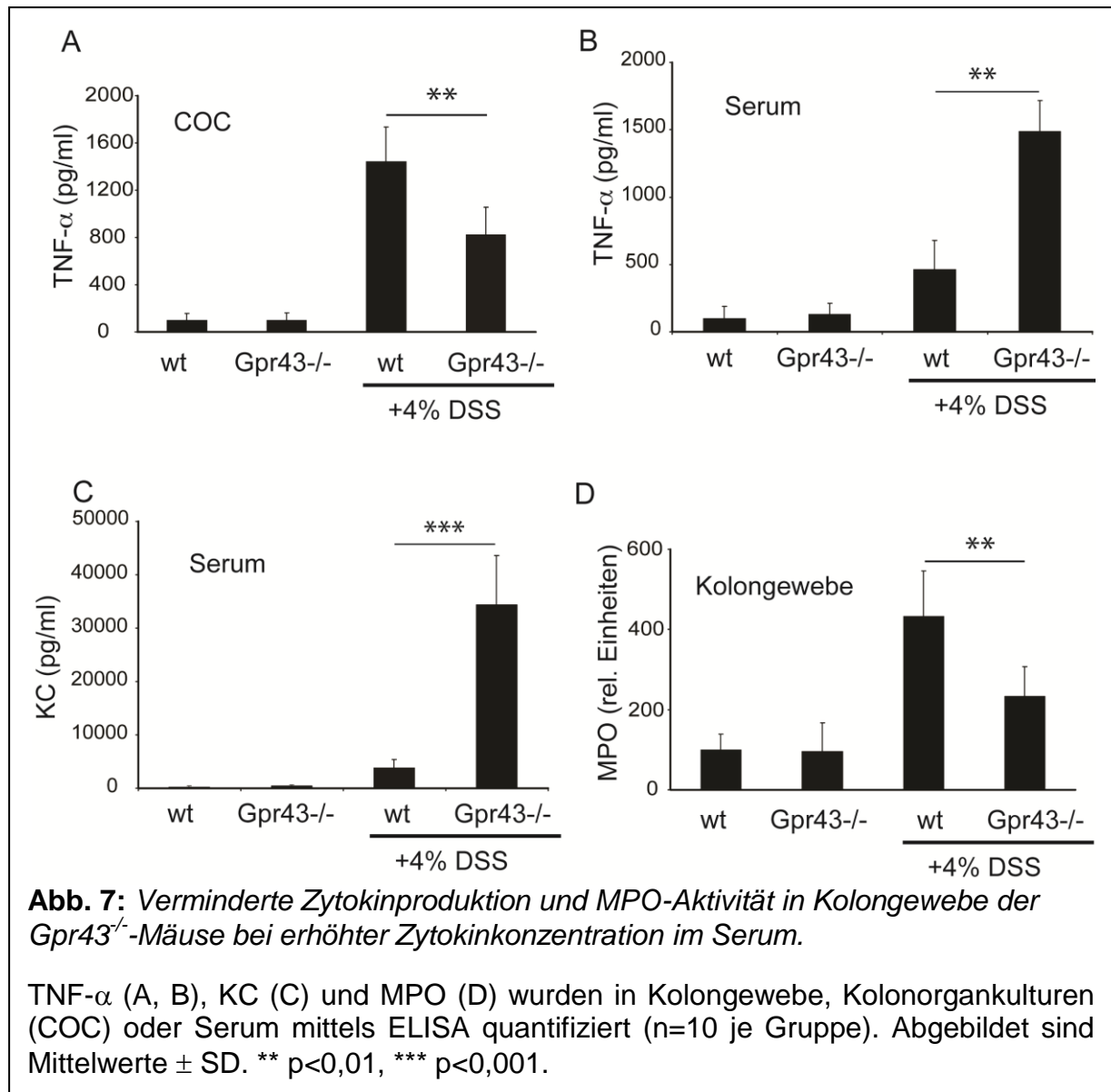
Im Index nicht repräsentiert sind die in den *Gpr43*^{-/-}-Tieren auffälligen intravaskulären Granulozytenkonglomerate, welche einer geringen submukosalen Granulozyteninfiltration gegenüberstanden. Diese wurde per PMN-Infiltrations (PMNI)-Index ermittelt, indem die Granulozytenzahl pro Augenfeld festgestellt wurde. Das Ergebnis ist grafisch in Abb. 6D dargestellt und verdeutlicht die verstärkte Invasion von Granulozyten in Wildtypmäusen (p<0,01).



3.2.3. Molekulare Marker der Entzündung

Molekularbiologische Indikatoren für das Entzündungsgeschehen in den Mäusedärmen stellten $TNF-\alpha$, KC und das für neutrophile Granulozyten spezifische Enzym Myeloperoxidase (MPO) dar. Als Probenmaterial im ELISA für $TNF-\alpha$ und KC

dienten Kolonorgankulturen (COC, nur TNF- α) und Serum um systemische gegenüber lokalen Effekten abzugrenzen. Für die MPO-Aktivitäts-Messung wurden kleine Darmstücke homogenisiert und verdünnt als Probe eingesetzt, da dieses intrazelluläre Enzym nur in Kolongewebe detektiert werden kann.



Gegenüber den Kontrolltieren zeigten sich in beiden DSS-Gruppen erhöhte Zytokinwerte. Die TNF- α -Werte zeigten in den COC eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den Gpr43^{-/-}-Mäusen (1242 pg/ml \pm 90,1 vs 1040 pg/ml \pm 136,7, p<0,01, Abb. 7A). Im Serum (Abb. 7B und Abb. 7C) wurden in den Gpr43^{-/-}-Mäusen gegenüber den Wildtypmäusen sowohl signifikant höhere TNF- α - als auch KC-Konzentrationen gemessen (TNF- α : 1627 pg/ml \pm 382,2 vs 507 pg/ml \pm 130,1,

$p < 0,01$; KC: 146486 pg/ml \pm 26927,3 vs 955 pg/ml \pm 510,6, $p < 0,001$). Die Konzentration von MPO (Abb. 7D) war im Kolongewebe der Wildtypmäuse signifikant höher als in den *Gpr43*^{-/-}-Mäusen ($p < 0,01$). Insgesamt stellte sich hier eine ambivalente Situation dar: Während sich bei den Wildtypmäusen eine starke lokale Entzündung im Darmgewebe abspielte, deuteten die laborchemischen Werte auf ein systemisches Geschehen bei den *Gpr43*^{-/-}-Mäusen hin.

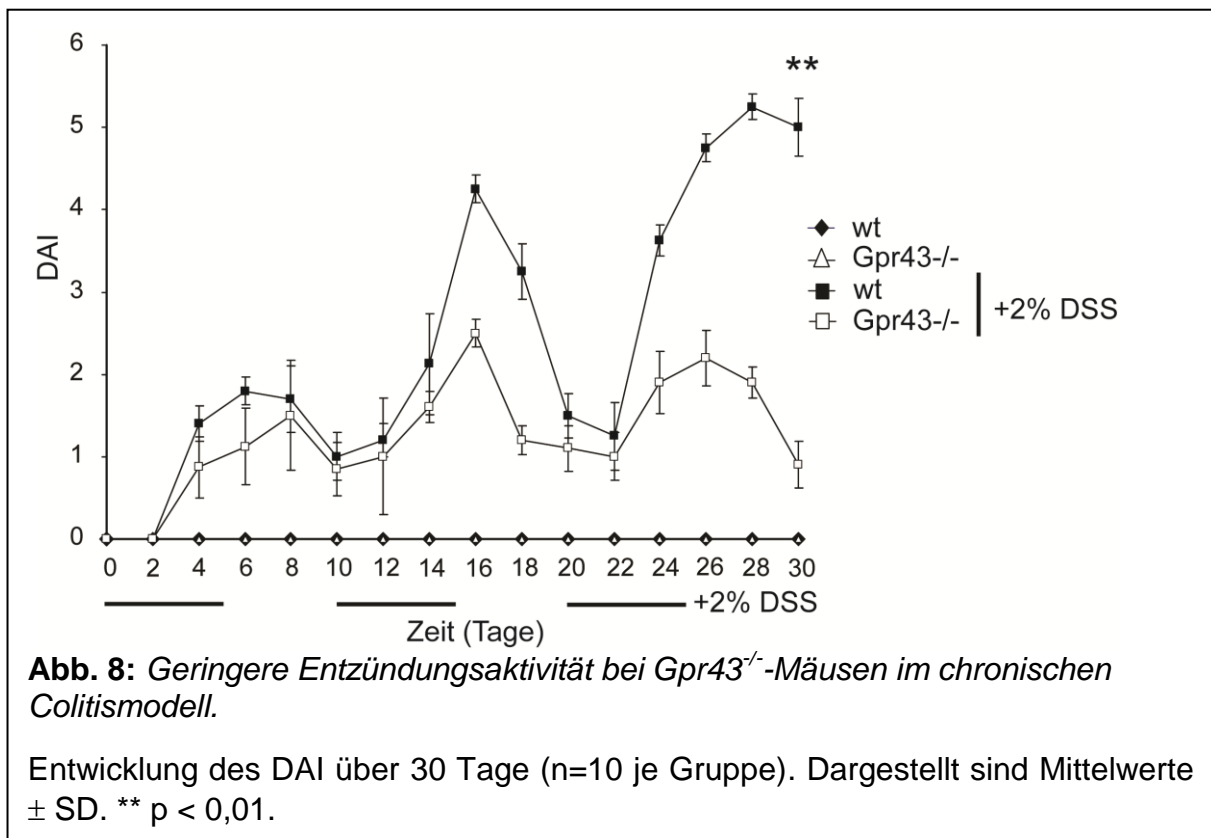
3.3. Chronische Colitis

Wie im Methodenteil beschrieben wurde durch in Zyklen appliziertes DSS eine chronische Entzündung der Mäusedärme induziert. Zur Charakterisierung der Entzündung wurden der klinische Phänotyp, Koloskopie, Histologie und das Zytokinprofil betrachtet und ausgewertet.

3.3.1. Phänotyp

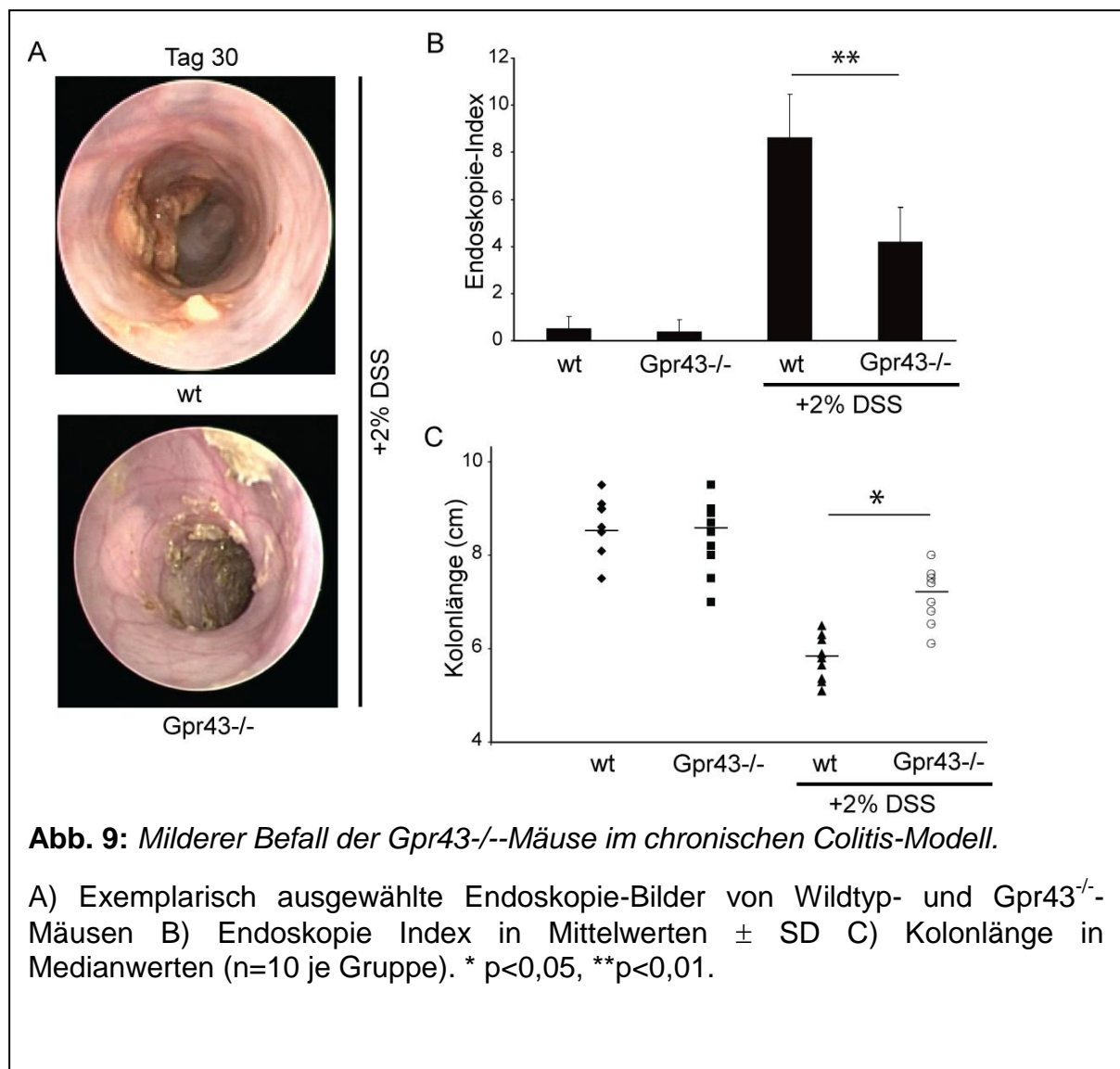
In dieser Versuchsanordnung überlebten alle Tiere die gesamte Versuchsdauer. Außerdem erkrankten alle Mäuse deutlich weniger schwer im Vergleich zum Verlauf der akuten Colitis. Die Einschätzung der chronischen Colitis erfolgte wiederum durch den angepassten DAI aus täglichen Gewichtsmessungen, Blutungsstärke und Einschätzung der Stuhlkonsistenz.

Abb. 8 illustriert die Ergebnisse dieser Messungen. Während der ersten DSS-Gabe erkrankten die Wildtypmäuse stärker als die *Gpr43*^{-/-}-Mäuse. Fortan zeigten sich immer höhere DAI-Werte für die Wildtypmäuse. In allen DSS-freien Intervallen wurde ein Rückgang der erfassten Symptome, jedoch keine komplette Remission, beobachtet. In den folgenden DSS-Intervallen zeigte sich eine ausgeprägtere



Krankheitsaktivität. Insgesamt war der schnellere Anstieg der Entzündungsreaktion besonders im letzten Zyklus bei Wildtypmäusen auffällig. Ebenso wies die Latenz im Erlangen der Restitution auf eine stärkere Krankheitsaktivität hin.

Die *Gpr43*^{-/-}-Mäuse zeigten eine durchgängig niedrigere Krankheitsaktivität, ein langsames Ansteigen der Entzündungsparameter, sowie eine schnellere Restitution. Die geringere Ausprägung der Entzündung in den *Gpr43*^{-/-}-Mäusen wird durch eine signifikante Differenz der Werte zwischen den Kohorten am 30. Versuchstag abgebildet ($p < 0,01$).



Alle Versuchstiere wurden an Tag 30 des Experiments koloskopiert. Abb. 9A zeigt exemplarische Aufnahmen von Tieren aus den DSS-Kohorten, anhand derer die Bewertung vorgenommen wurde. In der Analyse zeigte sich, dass die Wildtypmäuse

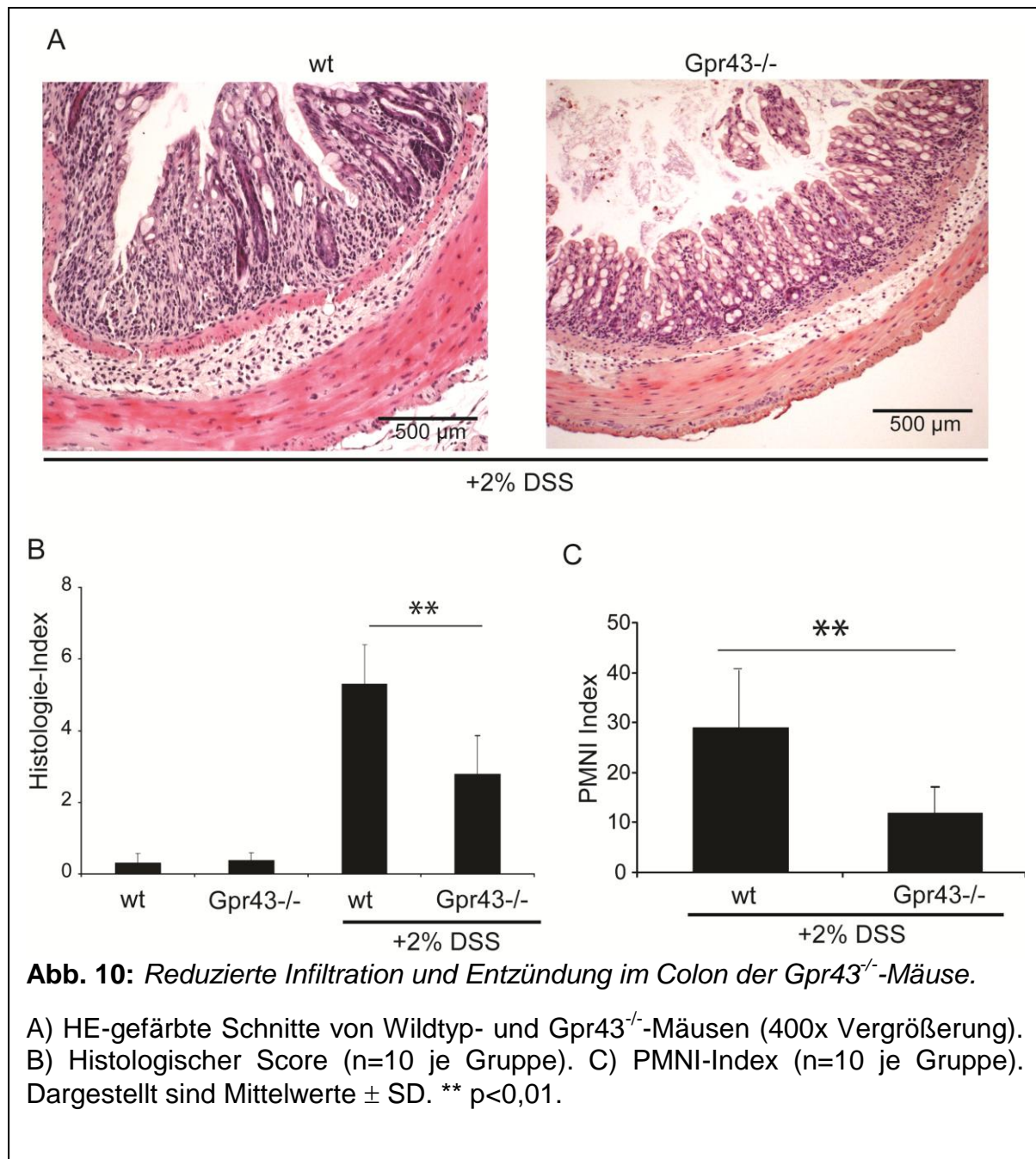
eine stärkere entzündliche Aktivität als die *Gpr43*^{-/-}-Mäuse aufwiesen. Die Mukosa war stark ödematös geschwollen. Vereinzelt Blutungen und stark verwässerter Stuhl waren zu sehen. Die *Gpr43*^{-/-}-Mäuse zeigten lediglich kleine Ulzerationen der Schleimhaut. Die Befunde wurden durch den Endoskopie-Index quantifiziert, welcher in Abb. 9B die signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und *Gpr43*^{-/-}-Mäusen aufzeigt ($8,6 \pm 1,8$ vs $5,6 \pm 2,2$; $p < 0,01$).

Den Versuchstieren wurde nach Tötung am Versuchsende das Kolon entnommen und die Länge gemessen. Abb. 9C zeigt die grafisch aufgearbeiteten Messwerte. Die Kolonlänge der Wildtypmäuse beim Versuchsende waren deutlich kürzer als die der *Gpr43*^{-/-}-Mäuse ($4,3 \text{ cm} \pm 0,3$ vs $6,5 \text{ cm} \pm 0,6$; $p < 0,05$).

3.3.2. Beurteilung der Infiltration von PMN

Mittels HE-gefärbter Darmabschnitte wurde das histologische Korrelat der Entzündung untersucht. Abb. 10A zeigt exemplarisch ausgewählte histologisch aufgearbeitete Präparate. In den Wildtypmäusen waren Ulzerationen der Mukosa mit z.T. hyperregenerativen Epithelabschnitten deutlich erkennbar und die submukosale Infiltration von Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen war deutlich ausgeprägt. In den *Gpr43*^{-/-}-Mäusen zeigten sich kaum Veränderungen des Kolons: Nur wenige Fissuren und geringe Granulozyteninfiltration in die Submukosa waren zu sehen. Allerdings waren auch hier vermehrte Granulozytenkonglomerate innerhalb der angeschnittenen Gefäße zu erkennen. Dieses Phänomen ließ sich in den Wildtypmäusen nicht nachweisen.

In Abb. 10B sind die durch einen histologischen Index ermittelten Ergebnisse dargestellt. Es zeigte sich, dass die Wildtypmäuse im Vergleich mit den *Gpr43*^{-/-}-Mäusen durchgängig höhere Werte aufwiesen ($4,43 \pm 1,09$ vs $2,78 \pm 1,08$; $p < 0,01$). Genauer quantifiziert wurde die Infiltration der Granulozyten in die Mukosa über den PMNI-Index. Die Resultate sind in Abb. 10C abgebildet und zeigen die deutlich verstärkte Invasion von Granulozyten in Wildtypmäusen ($p < 0,01$).

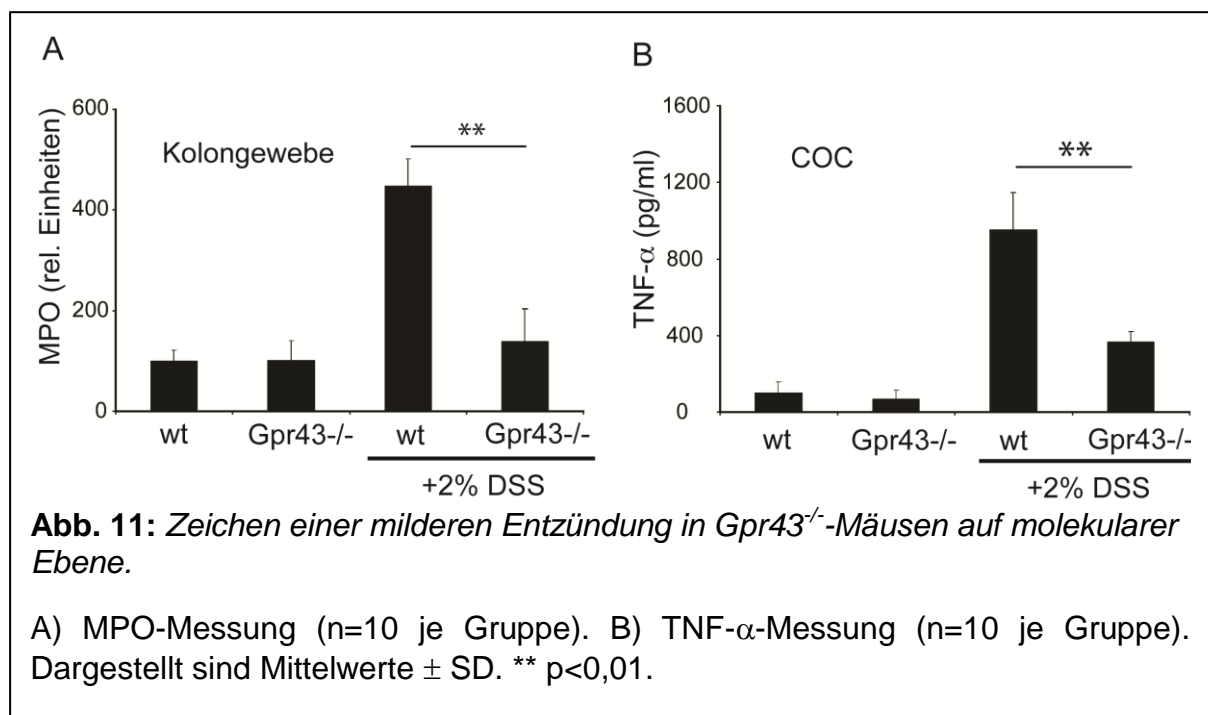


3.3.3. Molekulare Marker der Entzündung

Um die Entzündung auf molekularer Ebene zu charakterisieren, wurden verschiedene Marker via ELISA bestimmt. Hierzu dienten erneut TNF- α und das für neutrophile Granulozyten spezifische Enzym Myeloperoxidase (MPO). Für die Bestimmung von MPO wurden homogenisierte Darmstücke verwendet. Die Messung von TNF- α erfolgte in Kolonorgankulturen (s. Abb. 11).

Die Kontrolltiere zeigten keine Unterschiede in der MPO-Konzentrationen (160,9 ng/ml \pm 19,4 vs 158,06 ng/ml \pm 21,9). Im Kolon der Wildtypmäuse unter DSS-Gabe wurden signifikant erhöhte MPO-Werte gegenüber den *Gpr43*^{-/-}-Mäusen gemessen (328,93 ng/ml \pm 54,2 vs 178,65 ng/ml \pm 20,37; $p < 0,01$). Bei letzteren ließ sich eine leicht erhöhte Konzentration im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachten.

In der TNF- α -Messung zeigten die Kontrolltiere keine Unterschiede und nur eine geringe Konzentration im Überstand. Gegenüber dieser Gruppe wurden in den *Gpr43*^{-/-}-Mäusen leicht erhöhte und in den Wildtypmäusen signifikant erhöhte Werte gemessen ($p < 0,01$).



3.4. Funktionsanalyse von *Gpr43*^{-/-}-Zellen

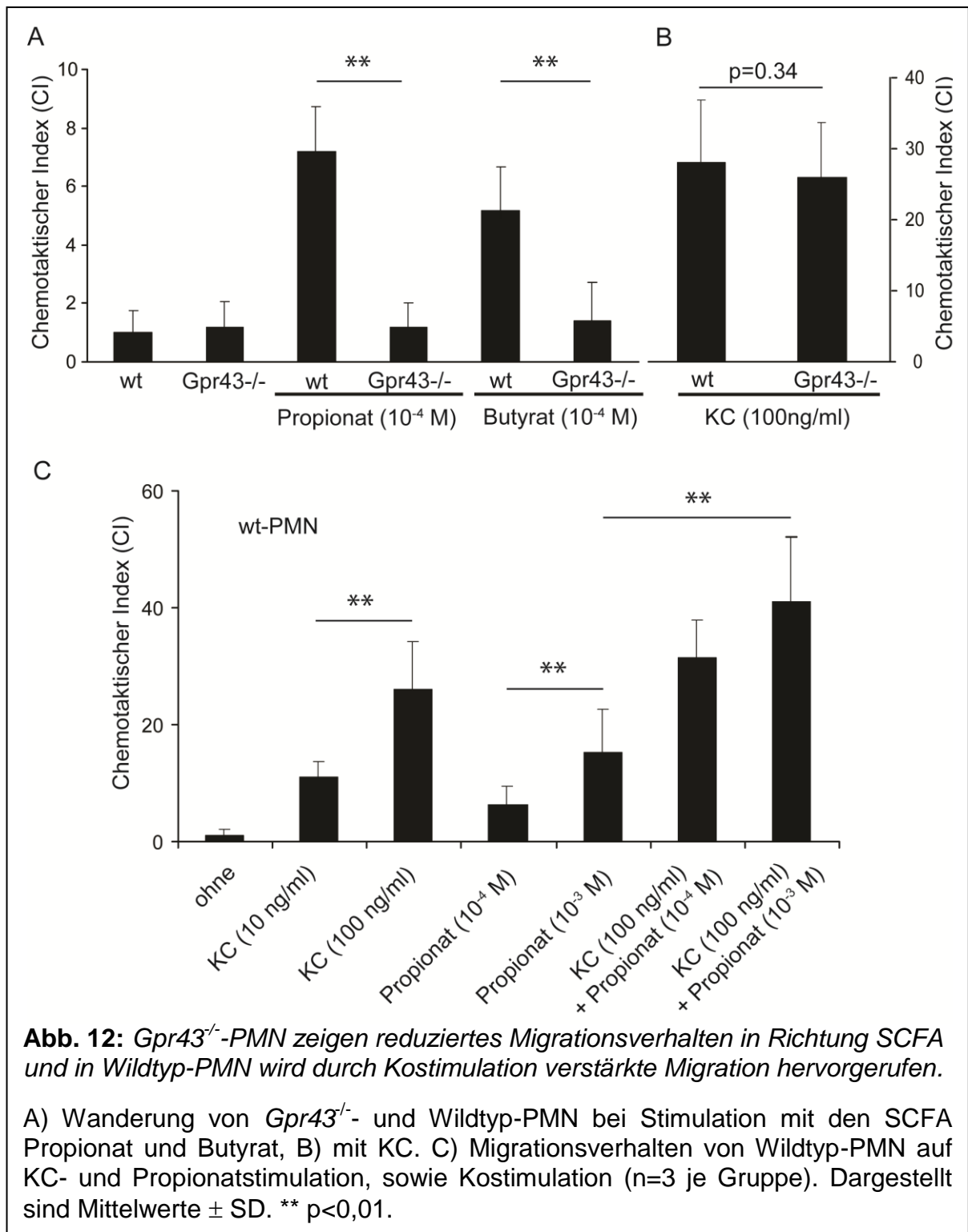
3.4.1. *Gpr43*-Abhängigkeit in der Migration

Zur funktionellen Analyse der neutrophilen Granulozyten wurde ein Transmigrations-Assay in der Boyden-Kammer durchgeführt (s. Abschnitt 2.12.). Die benötigten PMN-Zellen wurden mittels TG-Peritonitis aus Peritoneallavagen gewonnen (s. Abschnitt 2.11).

Als Stimulus diente Propionat und Butyrat sowie KC und PBS als unspezifischer Stimulus in unterschiedlichen effektiven Konzentrationen, die der Literatur entnommen wurden (115). Zur Quantifizierung wurde der chemotaktische Index verwendet (s. Abschnitt 2.12.).

Abb. 12A und 12B zeigen die Ergebnisse der Stimulationsversuche. Während die Stimulation von Wildtypzellen mit 10^{-4} M Butyrat bzw. Propionat eine ausgeprägte Migration zeigte, fehlte diese in den Ansätzen mit *Gpr43*^{-/-}-Zellen nahezu komplett ($p < 0,01$). Wurden die Zellen beider Mauskoorten jedoch mit 100 ng/ml KC stimuliert, fand sich ein vergleichbares Migrationsverhalten.

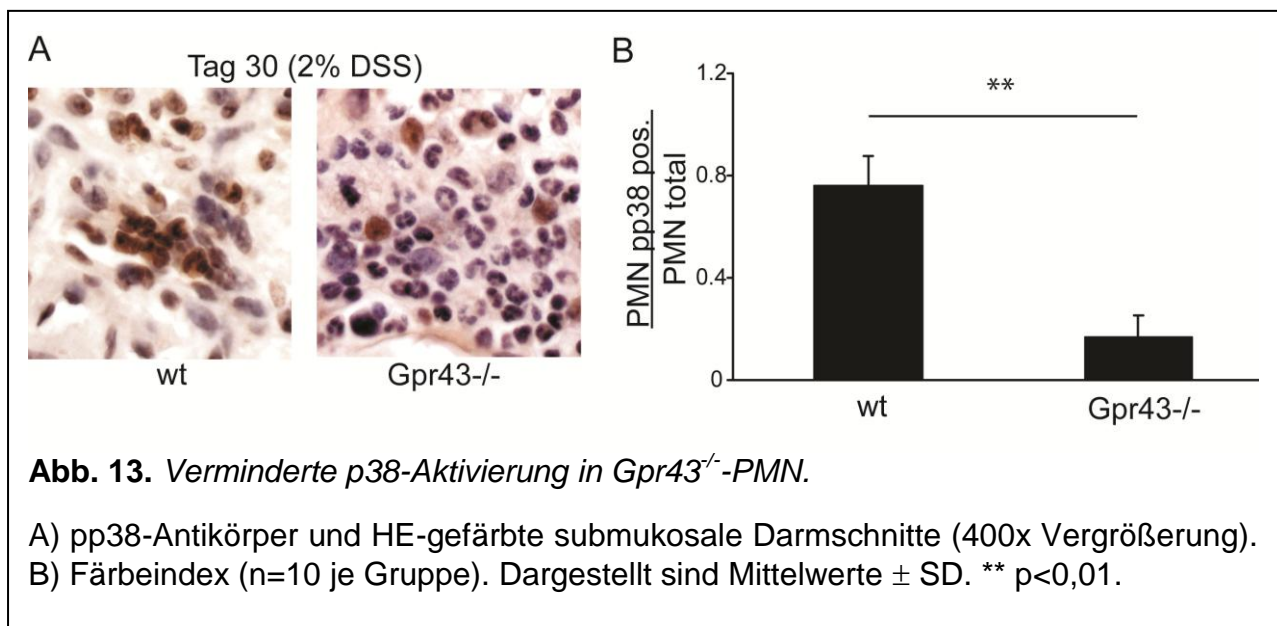
Verschiedene auf eine Zelle wirkende Stoffe lösen durch unterschiedliche Rezeptoren eine verstärkte Reizantwort aus. In welchem Ausmaß SCFA in Kombination mit dem stark chemotaktisch wirksamen KC PMNs aktivieren können, wurde im Anschluss untersucht. In diesem Ansatz wurden nur Wildtypzellen sowohl mit Propionat (10^{-3} bzw. 10^{-4} M) als auch mit 100 ng/ml KC allein und in Kombination stimuliert. Propionat und KC lösten dosisabhängig Chemotaxis aus (s. Abb. 12C). Bei Kostimulation mit 10^{-4} bzw. 10^{-3} M Propionat und 10 bzw. 100 ng/ml KC zeigte sich ein signifikant höheres Migrationsverhalten als bei Einzelstimulation ($p < 0,01$). Auch hier lag beim Migrationsverhalten eine Dosisabhängigkeit vor.



3.4.2. p38-Aktivierung

Eine Kreuzung der Signalkaskaden des KC-Rezeptors mit denen von Gpr43 ist an mehreren Positionen möglich. Die dadurch hervorgerufene verstärkte Aktivierung und Migrationsfähigkeit von neutrophilen Granulozyten wurde im vorigen Abschnitt gezeigt.

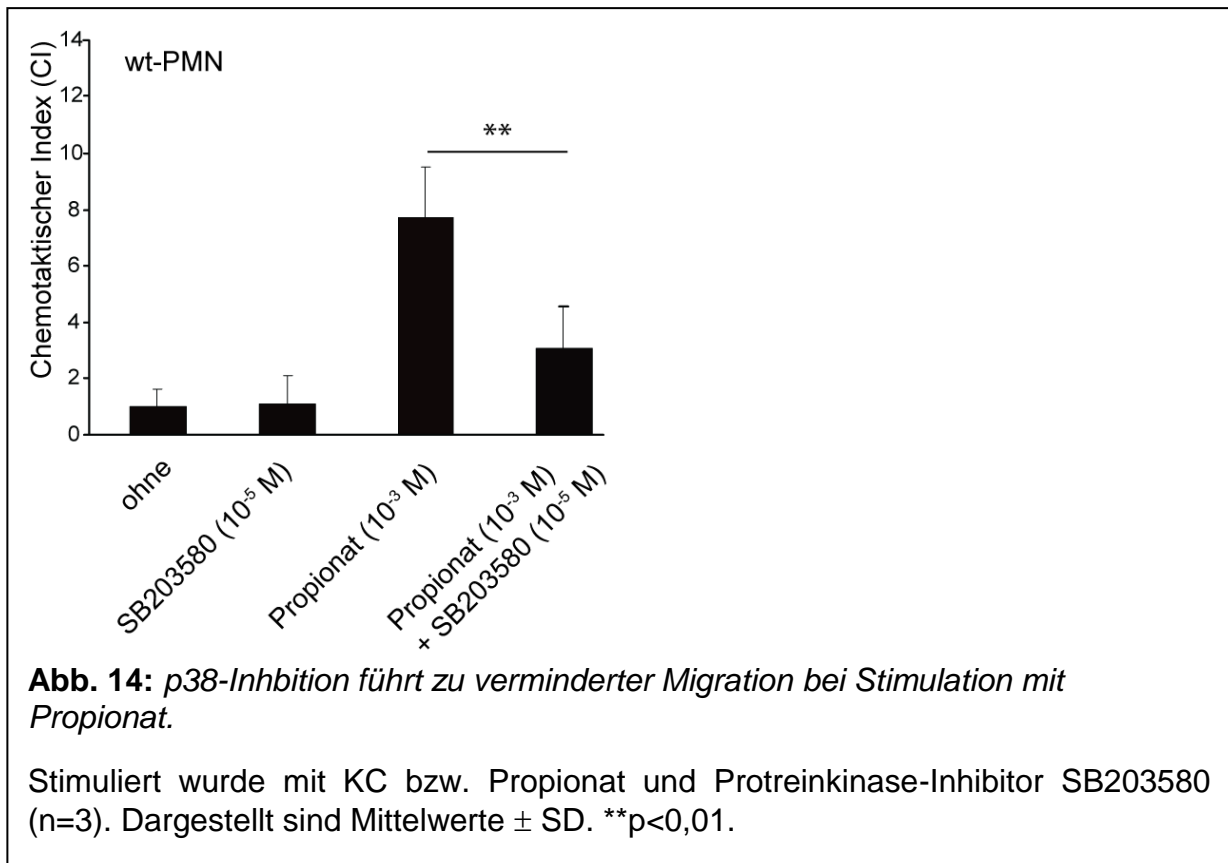
Ein bereits beschriebenes Ziel von Gpr43 ist die Proteinkinase p38 (115). Diese ist auch an der Einleitung von Zellmotilität beteiligt. Es wurde untersucht, inwiefern die Gpr43-abhängige p38-Phosphorylierung eine Rolle in der Rekrutierung und Migration von PMN spielt. Hierzu wurden histologische Schnitte aus der chronischen Colitis mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes p38 (pp38) gefärbt und ausgewertet. Die Resultate der histologischen Untersuchung zeigt Abb. 13A. In Wildtyp-Darmschnitten zeigte sich eine große Anzahl phospho-(p)p38-positiv gefärbter PMN-Zellen, während die *Gpr43*^{-/-}-Darmschnitte fast ohne spezifische Färbung blieben. Die Übertragung in einen Färbeindex zeigt eine signifikante Differenz zwischen den beiden Populationen ($p < 0,01$) (s. Abb. 13B).



In einem weiteren Versuch wurde die Phosphorylierung mittels des MAP-Kinase-Inhibitors SB203580 spezifisch inhibiert (10^{-5} M für 30 min.). Die mit diesem pharmakologischen Inhibitor inkubierten Zellen wurden anschließend in einer Boyden-Kammer auf ihre Wanderungseigenschaft untersucht.

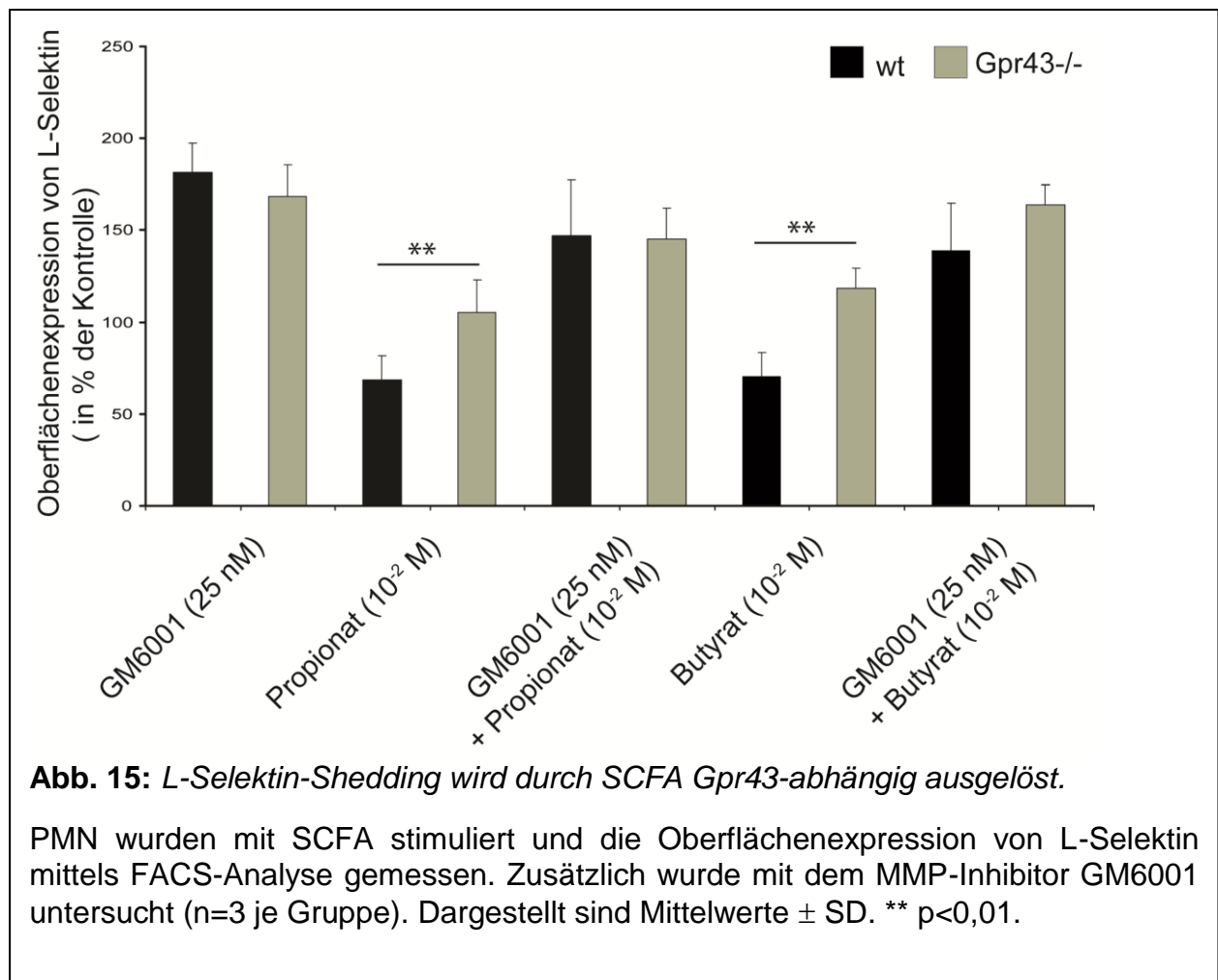
Wildtyp-PMNs wurden mit 10^{-3} M Propionat stimuliert. Zusätzlich wurde untersucht, ob der Inhibitor selbst eine chemotaktische Funktion besitzt.

Bei einer reinen Propionatstimulation zeigte sich das bekannte dosisabhängige Migrationsverhalten. Die alleinige Zugabe des Inhibitor SB203580 hatte keinen Einfluss auf die Migration der Zellen, während die p38-Inhibition durch SB203580 die Migrationstendenz in Richtung des Propionatstimulus verminderte. Diese lag signifikant unterhalb der mit reiner Propionatstimulation erzielten Chemotaxis ($p < 0,01$) (Abb. 14).



3.4.3. Gpr43-abhängiges L-Selektin-Shedding

Die zur Migration wichtigen L-Selektine werden u.a. über das TNF- α -Converting enzyme (TACE/ADAM-17), eine Matrixmetalloproteinase (MMP), reguliert, indem sie proteolytisch gespalten werden. Dieser Prozess des sog. *sheddings* ist p38-abhängig und dient der Trennung von Selektin-Bindungen mit dem Endothel und den daran gebundenen PMNs. Ob diese Kaskade in Abhängigkeit von Gpr43 verläuft, sollte durch die FACS-Messung der relativen Selektin-Expression auf der Oberfläche von PMNs nach Stimulation mit SCFA untersucht werden. Es wurde zusätzlich ein Inhibitor der Matrixmetalloproteinasen (GM6001) eingesetzt, um unspezifische Mechanismen der Selektin-Abspaltung auszuschließen.



Eine reine Propionat- bzw. Butyrat-Stimulation führte in den *Gpr43*^{-/-}-PMNs zu einer signifikant höheren Detektion von L-Selektinen auf der Zelloberfläche im Vergleich zu den Wildtyp-PMNs, d.h. hier fand keine Abspaltung der L-Selektine statt. Dieser Effekt konnte durch gleichzeitige Gabe des MMP-Inhibitor GM6001 aufgehoben werden, so dass vergleichbare Werte der Oberflächenexpression zu detektieren waren. Solch ein Ergebnis deutet auf eine Abhängigkeit des *shedding*-Prozesses von Gpr43 hin.

4. Diskussion

Die Grenzfläche zwischen Umwelt und Körper stellt eine komplexe und effektive Einheit unterschiedlicher Elemente dar. Im Darm besteht diese Barriere aus einer selektiv durchlässigen Epithelschicht verbunden durch *tight junctions* und einem Netzwerk von Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems (z.B. Makrophagen, neutrophile Granulozyten, T-Zellen). Das koordinierte Zusammenspiel dieser Faktoren ist Grundlage für die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase. Eine Vielzahl von Rezeptoren ist an der Unterscheidung von körpereigenen und -fremden Strukturen beteiligt. U. a. registriert der hier untersuchte Rezeptor Gpr43 kurzkettige Fettsäuren, die von anaeroben Bakterien produziert werden. Durch selektive Expression auf PMNs ist er in das Immunsystem eingebunden. Diese PMNs sind verantwortlich für die Produktion verdauender Enzyme und Sauerstoffradikalen und sind ursächlich an der Phagozytose von Mikroorganismen beteiligt. In einer realtime-PCR-Analyse (unveröffentlichte Ergebnisse) konnte eine erhöhte Expression von *GPR43* in Bereichen aktiver Entzündung bei Patienten mit CD und CU gefunden werden, was den Rezeptor erstmals indirekt in einen Zusammenhang mit diesen Krankheitsentitäten gestellt hat.

Als Schlüsselstellen der Ätiologie von CED werden neben einer veränderten und damit möglicherweise pathogenen Mikroflora des Darms (60) auch eine genetische Suszeptibilität mit Beteiligung des Immunsystems diskutiert (50). Die daraus resultierende Barrierestörung der Mukosa führt zu einer erhöhten Zytovasion durch Bakterien. Dabei spielen die immunkompetenten Zellen wie PMNs auf direkt Weg sowie ihre sezernierten Botenstoffe wie Zytokine eine große Rolle in der Initiierung und Aufrechterhaltung der akuten und chronischen Entzündung (29, 30).

Die DSS-Colitis gehört zu den etablierten Mausmodellen von experimentellen Darmentzündungen, die durch exogene Faktoren ausgelöst wird. Der genaue Wirkmechanismus von DSS auf den Darm ist derzeit nicht abschließend geklärt. Eine allgemein akzeptierte Hypothese ist, dass ein direkter toxischer Effekt auf die Epithelschicht eine Kombination von Sekundäreffekten hervorruft und dadurch die intestinale Entzündung initiiert (129). Fukata et al. konnten eine bakterielle Translokation in die Submukosa nach direkter Barrierschädigung durch DSS beobachten, die diese Annahme stützt (130).

In dieser Arbeit wurde erstmals in einem *Gpr43*^{-/-}-Modell der Effekt von SCFA auf das Migrationsverhalten von neutrophilen Granulozyten in einer DSS-Colitis und seine zugrundeliegenden molekularen Mechanismen untersucht.

4.1. Wahl des Colitis-Modells und Evaluation der Gendeletion

Mausmodelle für CED können nicht die gesamte Komplexität der Erkrankung widerspiegeln und ersetzen auch nicht Studien an Patientenmaterial. Sie sind jedoch zum Verständnis einzelner isolierter Aspekte gut geeignet, reproduzierbar und sehr gut validiert (129). Durch die unterschiedlich lang andauernde Applikation von DSS im Trinkwasser können beispielsweise akute und chronische Modelle für intestinale Entzündungen erzeugt werden. Die direkte toxische Wirkung des Agens auf den Epithelverband der Mukosa bildet nicht den exakten pathophysiologischen Hintergrund der CED ab, erzeugt aber vergleichbare histologische und makroskopische Ergebnisse, die dem Erscheinungsbild einer Darmentzündung ähnlich sind (119). Neben den chemisch induzierten Colitis-Modellen besteht noch eine große Anzahl von Modellen, die durch Gendeletionen hervorgerufen werden (129). *IL-10*^{-/-}- und *Signal transducer and activator of transcription (Stat)3*^{-/-}-Mäuse entwickeln beispielsweise spontan Colitiden. IL-10 ist ein bekannter Suppressor der TH₁-Zellen und von Makrophagen sowie der Ausschüttung von TNF- α und wirkt damit immunsuppressiv. Stat3 ist in dieser Kaskade ein wichtiger vorgeschalteter Mediator. Beide spielen eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (131, 132). *Multidrug resistance (Mdr) 1*^{-/-}-Mäuse wiederum entwickeln regelhaft eine Dickdarmentzündung und Adenokarzinome im Kolon (133).

Aufgrund der einfachen Handhabung und der zuverlässigen und reproduzierbaren Induktion der Colitis sowie den zahlreichen Untersuchungen mit gleichem Verfahren bietet sich das hier gewählte Modell besonders dafür an, die eigene Fragestellung nach den Auswirkungen in einem *Gpr43*^{-/-}-Mausmodell beantworten und vergleichen zu können. Das DSS-Modell bei Knockout-Mäusen fügt sich gut in die Entstehungshypothese der CED ein, in der von einem Aufeinandertreffen genetischer Risikofaktoren und einem oder mehrerer Umwelteinflüsse ausgegangen wird.

4.2. Funktion von Gpr43 in DSS-Colitis-Modellen

4.2.1. Gpr43-Defizienz führt im akuten Modell zu erhöhter Todesrate durch Bakteriämie

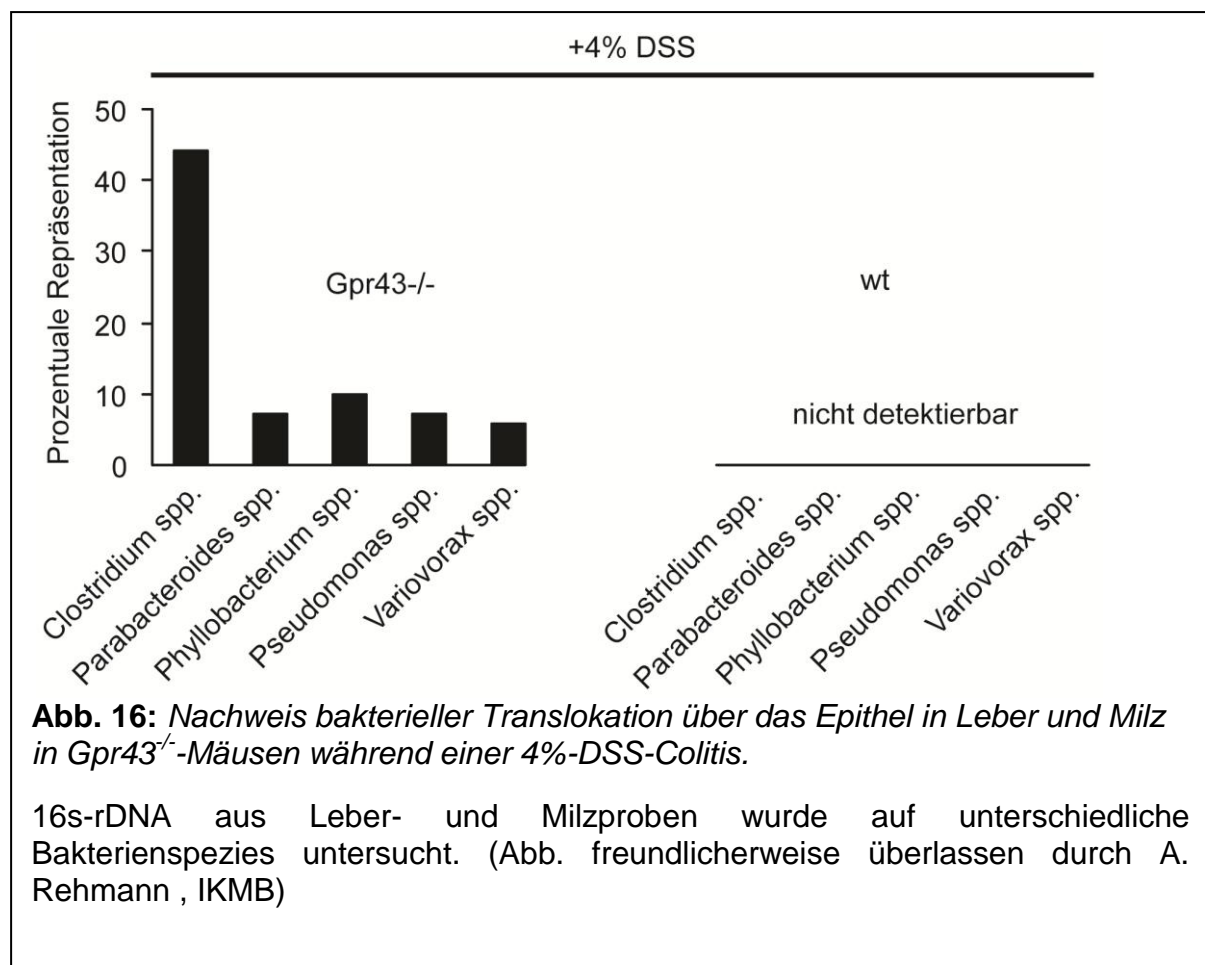
In der akuten Phase des DSS-Modells wurde anhand der phänotypischen Erscheinungen die Aktivität der Erkrankung verfolgt. Mit der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die *Gpr43*^{-/-}-Mäuse im DAI höhere Werte als die Wildtypmäuse erlangten und damit zunächst Zeichen einer stärkeren Entzündung aufwiesen. Besonders auffällig war die Letalität aller Versuchstiere in der *Gpr43*^{-/-}-Kohorte während des Untersuchungszeitraumes. Die Endoskopie- und Histologieergebnisse zeigten jedoch ein gegensätzliches Bild mit stärkerer Affektion der Wildtypmäuse.

Die Zytokin-Analyse offenbarte ein in sich ambivalentes Bild: Einerseits war ein drastischer Anstieg der KC- und TNF- α -Werte im Serum der *Gpr43*^{-/-}-Mäuse zu verzeichnen, während andererseits die Messungen für MPO und TNF- α in der Überstandsflüssigkeit von Kolon-Kulturen aus den Wildtypmäusen stärker erhöht waren. Bei letzteren deuten die erhobenen Daten damit auf eine lokale Dickdarmentzündung hin.

Im Falle der *Gpr43*^{-/-}-Mäusen weist jedoch die überraschende Situation aus schlechter klinischer Erscheinung sowie pathologischen Laborwerten und relativ guten histologischen und endoskopischen Resultaten auf eine systemische Infektion hin. Entsprechende Zustände finden sich sonst überwiegend bei septischen Zuständen z.B. nach Verlust großflächiger Grenzflächen, u.a. bei Peritonitis und Verbrennungen (134, 135). Gleichzeitig wird dadurch der mildere Verlauf der lokal ablaufenden Colitis maskiert und wird im DAI nicht entsprechend abgebildet.

Zum Nachweis der Barrierestörung mit fataler Infektion wurden in einer weiterführenden Untersuchung Milz- und Leberproben der verwendeten Mäuse in Kooperation mit A. Rehmann (IKMB) auf die Anwesenheit von 16S-rDNA aus bakterieller Darmflora untersucht. Tatsächlich konnte in der aus der vorliegenden Dissertationsarbeit hervorgegangenen Arbeit gezeigt werden, dass sich genetische Signaturen von mehreren Bakterienstämmen in den *Gpr43*^{-/-}-Mäusen fanden, während die Gewebeproben der Wildtypmäuse steril waren. Quantitativ den größten Anteil machte die 16S-rDNA von *Clostridium spp.* aus (s. Abb. 16) (136). Es ist davon auszugehen, dass der foudroyante klinische Verlauf der *Gpr43*^{-/-}-Mäuse durch

den Zusammenbruch der mukosalen Barriere und einer folgend größeren Translokation von Bakterien mit konsekutiver Sepsis erklärt werden kann.



4.2.2. Einfluss der reduzierten Migrationsfähigkeit der PMN auf die chronische Entzündungsreaktion

Zur Untersuchung der chronischen Auswirkungen des entzündlichen Geschehens wurde die DSS-Gabe auf 2% (w/v) reduziert und in mehreren Zyklen gegeben. Anhand der erhobenen Parameter konnte gezeigt werden, dass – im Gegensatz zum akuten Modell – die *Gpr43*^{-/-}-Mäuse geringere Zeichen einer Entzündung (u.a. signifikant niedrigere Zytokinspiegel in Kolonkulturen) aufwiesen. Besonders im DAI ließen sich keine starken Schwankungen feststellen. Die Endoskopie und Histologie verdeutlichten, dass die Mukosa der *Gpr43*^{-/-}-Mäuse weitestgehend intakt geblieben war, während die Wildtypmäuse eine stärkere entzündliche Aktivität aufwiesen. Histologisch fiel zudem auf, dass viele der *Gpr43*^{-/-}-PMN nicht aus dem Gefäßsystem herauswandern konnten und vielmehr intravasale Konglomerate bildeten.

Die Zerstörung von umgebendem und häufig auch gesundem Gewebe stellt ein bekanntes Phänomen der chronischen Phase einer Entzündung dar: PMN und ihre sezernierten Enzyme (u.a. neutrophile Elastase, Matrixmetalloproteinasen) beseitigen nicht nur Fremdkörper oder -organismen, sondern haben einen erheblichen Anteil an diesem Umgebungsschaden (137, 138). Darüber hinaus unterhalten währenddessen sezernierte Zytokine die Entzündung im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus (30). Zu einem nicht näher bestimmbareren Zeitpunkt entsteht ein Gleichgewicht aus pro- und anti-inflammatorischen Signalen, welches zunächst zur Abschwächung und später zum endgültigen Versiegen der Entzündungsreaktion mit dem Ergebnis einer *restitutio ad integrum* führt. Das krankhaft chronische Stadium hingegen, wie z.B. bei CED, wird jedoch durch ein Ungleichgewicht zugunsten eines dauerhaften Überwiegens der pro-inflammatorischen Signale gekennzeichnet. Dadurch werden zerstörende Abwehrmechanismen gefördert und über das physiologische Maß hinaus unterhalten, resultierend in einem Zusammenbruch der schützenden Barriere.

Im letzten Zyklus des chronischen DSS-Modells zeigte sich dieser Effekt besonders deutlich durch eine Potenzierung des DAI bei den Wildtypmäusen. Dieser *Circulus vitiosus*, welcher u.a. durch stetes Einwandern von neutrophilen Granulozyten die Entzündung dauerhaft aufrecht erhält, konnte durch die *Gpr43*-Deletion durchbrochen werden. Daher deuten die Daten der chronischen Colitis im Gegensatz zur akuten Colitis darauf hin, dass eine reduzierte PMN-Migration sich protektiv auf die chronische Entzündungsreaktion auswirkt.

Unterstützung findet diese Hypothese in Untersuchungen mit PMN-depletierten Mäusen durch die Gabe von CD18-Antikörpern in einer experimentellen Spirochäteninfektion (139) und durch die Einführung von TNF- α -Antikörpern (140) sowie Azathioprin (141) in die CED-Therapie. Diesen Untersuchungen bzw. Therapieansätzen gemeinsam ist die Ausschaltung eines einzelnen Faktors im komplexen Gefüge des Immunsystems mit einer protektiven Wirkung auf die chronische Entzündung. Hinzu kommt eine geringere intestinale Permeabilität, die vor zusätzlich bakterieller Invasion schützt (142). Auf der Kehrseite dieser Medaille steht jedoch die endogene Reaktivierung von bakteriellen Infektionen wie durch *M. tuberculosis* z.B. bei der TNF- α -Antikörper-Therapie (143) infolge iatrogener Immunsuppression.

Ogleich die klinischen Ergebnisse des akuten und chronischen Modells einen offensichtlichen Unterschied aufwiesen, offenbarte die histologische Analyse eine wiederkehrende Gemeinsamkeit in Form von Granulozyten-Konglomeraten in den Blutgefäßen der *Gpr43*^{-/-}-Mäuse bei weniger Granulozyten in der Submukosa. Die Ursache der stärkeren klinischen Beeinträchtigung konnte mutmaßlich auf die toxischen Effekte des DSS zurückgeführt werden und wurde bereits zuvor erläutert. Die Evasionfähigkeit hingegen war aber in beiden Studiendesigns gleichermaßen beeinträchtigt.

Analog zur Hypothese, SCFA seien maßgeblich an der Emigration von PMN beteiligt (97), stellte sich die Frage, ob die PMN-Migration auch in einem sterilen Modell ohne die Anwesenheit von SCFA gehemmt ist. In einem AirPouch-Modell (144) konnte in Kooperation mit B. Raabe, A. Chalaris und J. Scheller (alle Institut für Biochemie, CAU Kiel) gezeigt werden, dass die Wanderung von *Gpr43*^{-/-}-PMNs *per se* nicht beeinträchtigt ist. In diesem Entzündungsmodell wurden Zellen über die Applikation eines chemotaktischen Stimulus (Carageenan) in eine Hauttasche geleitet. Zwischen den genetisch veränderten Mäusen und einer Kontrollgruppe wurde kein Unterschied in der Menge an Granulozyten in der Tasche gefunden (136).

Die *Gpr43*-Defizienz scheint sich also in Form von vermindertem Extravasationsvermögen der Granulozyten nur dann auszuwirken, wenn mehrere Signale, u.a. SCFA, involviert sind. Dies spricht für die unmittelbare Beteiligung von *Gpr43* an diesem Prozess.

4.3. Funktionelle Analyse der *Gpr43*-Defizienz

Um ein molekulares Erklärungsmodell für die unterbliebene Evasion der Granulozyten zu schaffen, wurden PMNs *ex vivo* in Chemotaxisexperimenten mit der Boyden-Kammer eingesetzt.

4.3.1. *Gpr43*-Defizienz verhindert SCFA-abhängige Migration *ex vivo*

Während Wildtyp-PMNs in der Migrationskammer ein von der SCFA-Dosis abhängiges Migrationsverhalten zeigten, blieb dieses bei *Gpr43*^{-/-}-Zellen gänzlich aus. Vinolo et al. konnten *in vivo* und *in vitro* ebenfalls Chemotaxis nach SCFA-

Stimulation von neutrophilen Granulozyten zeigen. Die Arbeitsgruppe ließ den dahinterstehenden Mechanismus weitestgehend ungeklärt, konnte jedoch eine gesteigerte L-Selektin-Expression feststellen (97). Dass die Migrationsfähigkeit *per se* nicht durch den Genverlust beeinträchtigt war, konnte in der vorliegenden Arbeit *ex vivo* anhand der Stimulation mit KC gezeigt werden: Beide PMN-Gruppen zeigten ein von der KC-Konzentration abhängiges Wanderungsverhalten.

4.3.2. Proteinkinase p38 als wichtiger Mediator in der Gpr43-vermittelten Chemotaxis

Yonezawa et al. identifizierten die Proteinkinase p38 als Ziel von Gpr43 (115). Sie ist hauptsächlich beteiligt an Signaltransduktionen von Rezeptoren in den Zellkern und wird durch Phosphorylierung aktiviert. Wichtige Aktivatoren sind TNF- α , IL-1 β und TGF- β , sowie SCFA (115). Zusätzlich ist die Kinase an der Migration von neutrophilen Granulozyten beteiligt (145, 146).

Mittels immunhistologischer Färbungen wurde in den Wildtypmäusen deutlich mehr phosphoryliertes p38 detektiert als in *Gpr43*^{-/-}-Mäusen. Die spezifische Inhibition *ex vivo* mittels des MAPK-Inhibitors SB203580 führte erwartungsgemäß zu einer verminderten Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten von Wildtypmäusen im Migrationsexperiment und verdeutlicht damit seine Schlüsselposition in der Gpr43-abhängigen Aktivierung von PMN durch SCFA.

Damit stellt die Blockierung von p38 eine denkbare therapeutische Option dar. Zwei vergleichbare Studien zeigten in den letzten Jahren jedoch unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der klinischen Wirkung der p38-Blockade im Mausmodell: In einer 3% DSS-Studie mit SB203580 zeigte sich eine verminderte Entzündungsreaktion (147), während bei Verwendung eines anderen pharmakologischen Inhibitors (FR167653) und 3,5% DSS eine verstärkte Entzündung aufgezeigt werden konnte (148). Als potentielle Ursache kommen für diese unterschiedlichen Ergebnisse entweder unterschiedliche Ansatzpunkte im Kaskadensystem (z.B. zeitlich später, nachdem die Entzündungsreaktion eingeleitet wurde), eine unspezifischere Bindung (z.B. gleichzeitige Hemmung von NF- κ B) oder Blockierung regenerativer Mechanismen in Frage.

4.3.3. *Gpr43 ist essentiell für L-Selektin-Shedding*

PMNs können in Abhängigkeit von SCFA aktiviert werden. Ein wichtiger Faktor der Aktivierung stellt die Vorbereitung der Zelle zur Extravasation und Migration dar. Hierfür ist eine spezifische Expression bestimmter Rezeptoren zur Liganden-Bindung besonders bedeutend.

Die Migration von PMNs aus dem Blut in das Gewebe ist ein Prozess mit mehreren chronologisch erfolgenden Schritten: (1) Die Zellen werden im Blutstrom verlangsamt und (2) rollen entlang der Gefäßinnenwand, um zunächst (3) kovalente Bindungen durch L-Selektine einzugehen und schließlich nach erfolgtem *shedding* (4) das Gefäßsystem durch Endothelspalten zu verlassen (149). Dieser Mechanismus scheint im Kontext der hier erhobenen Daten ein kritischer Punkt zu sein: Während die Adhäsion unbeeinträchtigt erschien, war die Evasion behindert, so dass sich die Zellen stattdessen an den Gefäßwänden zu Konglomeraten sammelten. Wie zuvor diskutiert wird der Verlust von *Gpr43* eine Modifikation in der Aktivierungskaskade hervorgerufen haben, die den physiologischen Ablauf der Evasion be- oder verhindert.

L-Selektine spielen eine wichtige Rolle im Übergang zwischen diesen Phasen der Migration. Die Adhäsion an das Endothel wird erst durch eine hohe Expression dieser „Gewebeanker“ möglich. Um anschließend die Lösung dieser Bindung herbeizuführen, spalten Schnitt-Moleküle (sog. *Sheddases*, z.B. MMPs wie TACE/ADAM-17) die Ektodomäne des L-Selektin ab und lösen damit die Zell-Zell-Verbindung. Erst dieser Schritt befähigt die Zellen zum Verlassen des Gefäßsystems. Wie in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, stellt dieser Mechanismus zusätzlich ein Rückkopplungssignal für die weitere Rekrutierung von Leukozyten und den weiteren Evasionsprozess über sekundäre Effekte dar (150-152).

Für das pro-inflammatorische Zytokin und potente Chemokin IL-8 ist bereits bekannt, dass es *shedding* initiieren kann (100). *In vitro* konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass auch SCFA L-Selektin-*shedding* in Abhängigkeit von *Gpr43* einleiten können. Überträgt man diese Untersuchungen auf die Ergebnisse der Mausexperimente, kann sich die fehlende Evasion in den *Gpr43*^{-/-}-Mäusen durch verlorene *shedding*-Fähigkeit erklären. In anderweitig durchgeführten Untersuchungen konnte ebenfalls eine verminderte Migration und damit ein

protektiver Effekt gezeigt werden, wenn monoklonale Antikörper gegen L-Selektine verwendet oder KO-Modelle untersucht wurden (153-155). In Untersuchungen, die *shedding in vivo* pharmakologisch durch KD-IX-73-4 inhibierten, wurde ein deutlich verlangsamtes Rollen der Leukozyten beobachtet (150).

In einem ADAM-17^{-/-}-Mausmodell hingegen wurde durch Gabe von 2% DSS eine verstärkte entzündliche Aktivität ausgelöst (156). Die Autoren vermuten als dahinterstehenden Mechanismus die Spaltung weiterer an Entzündungsmechanismen beteiligter Strukturen wie der pro-inflammatorischen Signalmoleküle STAT3 und TNF- α . In einem Modell mit STAT3-defizienten Epithelzellen konnten vergleichbare Ergebnisse beobachtet werden (157).

Dass die *Gpr43*^{-/-}-PMN ein Defizit in der Migration sowohl *in vivo* als auch *in vitro* aufzeigen, verdeutlicht die Notwendigkeit der proteolytischen Spaltung des L-Selektins zur Extravasation von neutrophilen Granulozyten an Orten hoher entzündlicher Aktivität.

4.4. Ausblick

Eines der Schlüsselereignisse in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen bildet die verstärkte Migration von aktivierten Leukozyten in das erkrankte Darmgewebe. Die Entzündung wird durch ein komplexes Gefüge aus Signalkaskaden aufrechterhalten, ohne dass hierfür ein offensichtlicher Grund, wie z.B. eine akute Infektion, besteht.

Dem Grundgedanken folgend, dass zum Durchbrechen dieses *Circulus vitiosus* die Reduzierung der migrationsfähigen PMNs nötig ist, gibt es derzeit mehrere Ansätze: (1) Antikörper gegen TNF- α (z.B. Infliximab) haben in der Form Einzug in die Standardtherapie gefunden (140), als dass sie durch Neutralisierung dieses pro-inflammatorischen Zytokins die überschießende Entzündungsreaktion unterdrücken. (2) Ein spezifischerer Ansatz wird durch den Einsatz von direkter Antagonisierung von Integrinen (z.B. Natalizumab) (158) und PMN-Depletion durch Immunapherese (159) verfolgt. (3) Die MAPK p38 ist (wie auch in dieser Arbeit gezeigt wurde) am Migrationsprozess beteiligt, so dass MAPK-Inhibitoren bzw. Eingriffe in deren Signalkaskaden ebenfalls erfolgreich in der CED-Therapie eingesetzt werden. Ihr Nachteil wurde bereits zuvor dargestellt. (4) In einer weiteren Untersuchung wurde

die neutrophile Elastase durch Antikörper antagonisiert um den Umgebungsschaden im Zuge einer überschießenden Entzündungsreaktion zu minimieren (160).

Mit den vorliegenden Daten reiht sich GPR43 in die möglichen therapeutischen Zielstrukturen bei dieser Erkrankungsgruppe ein. Die hier präsentierten präklinischen Daten zeigen besonders in der chronischen Entzündungskonstellation einen protektiven Effekt durch *GPR43*-Deletion bzw. Blockade seiner Signalkaskade. Die Ergebnisse des akuten Modells zeigen jedoch auch deutlich den Schwachpunkt dieses Ansatzes, nämlich den feinen Balanceakt zwischen positiven und negativen Effekten der Ausschaltung von PMNs. Die verminderte Evasion muss gegenüber der Immunsuppression so austariert sein, dass es nicht zu einer Barrierestörung, erhöhter bakterieller Translokation und infolge dessen fatalen Infektionen kommt. Vergleichbar ist dies mit Eingriffen in das IL-12-System: Zeigten *IL12^{-/-}*-Mäuse ein erhöhtes Auftreten von septischen Ereignissen im Colitis-Modell (161), so konnten klinische Studien mit IL-12-Antikörpern erhöhte Remissionsraten zeigen (162, 163). Auch hier steht dem therapeutischen Erfolg eine erhöhte Infektionsrate mit *Salmonella spp.* und Mykobakterien gegenüber (164, 165).

Diesen neuen Versuchen und ihren aussichtsreichen (Teil-)Erfolgen, die chronische Entzündung zu bekämpfen, stehen derzeit noch die teils drastischen Nebenwirkungen gegenüber, die z.T. auch unabhängig von der immunsuppressiven Situation sind (148, 166).

Gemeinsam mit den in der Arbeit erhobenen Befunden weisen die Daten auf die physiologische Bedeutung einer „normalen“ Entzündungsreaktion hin. Nur ein tiefergehendes Verständnis der positiven und negativen Auswirkungen der Blockade eines molekularen „Schalters“ wie GPR43 kann die Frage beantworten, ob ein solches Konzept in der Klinik umgesetzt werden kann.

4.5. **Beantwortung der Fragestellung**

Zusammenfassend lassen sich die eingangs gestellten Fragen beantworten:

- *Gpr43*^{-/-}-Mäuse verhalten sich unterschiedlich im chronischen und im akuten Modell einer DSS-induzierten Colitis. Im ersteren scheint der Genverlust protektive Wirkung auf die Stärke der Entzündung zu haben, während im letzteren ein erhöhte Mortalitätsrate und epitheliale Bakterientranslokation mit konsekutiver Sepsis gegenüber Wildtypmäusen beobachtet werden kann. Ein spontanes Auftreten einer Colitis ohne Zusatz von DSS zeigte sich nicht in *Gpr43*^{-/-}-Mäusen.
- *Per se* haben *Gpr43*^{-/-}-PMNs kein aberrierendes Migrationsverhalten. Sie weisen jedoch eine verminderte Aktivierung nach Stimulation mit SCFA im Vergleich zu Wildtypmäusen auf. Bezüglich des Migrationsverhaltens konnte ebenfalls eine geringere Aktivität beobachtet werden. In diesem Zusammenhang waren besonders die intravasalen Zellkonglomerate *in vivo* auffällig. *Ex vivo* konnte dies in Transmigrationskammer-Versuchen bestätigt werden.
- Die herabgesetzte Motilität und besonders die Evasion aus dem Gefäßsystem lässt sich durch eine verminderte p38-Aktivierung infolge des *Gpr43*-Verlustes mit konsekutiv fehlendem *L-Selektin-shedding* erklären.

5. Zusammenfassung

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind die wichtigsten Entitäten der chronisch entzündlichen Darmkrankheiten (CED), deren Ursachen und Therapie derzeit Gegenstand der Forschung sind. Eine Kombination aus genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren wird aktuell diskutiert. Diese resultiert in einer Barrierefunktionsstörung der Darmmukosa, die Grundlage eines chronisch entzündlichen Geschehens ist.

Der G-Protein gekoppelte Rezeptor (GPR) 43 wird in entzündeten Arealen auf neutrophilen Granulozyten (PMN) verstärkt exprimiert. Er detektiert kurzkettige Fettsäuren (SCFA), die von anaeroben Bakterien der Darmflora produziert werden, und aktiviert Migrationsprozesse. Für die vorliegende Arbeit wurden *Gpr43*-Knockout-Mäuse gezüchtet, um ihr Verhalten im Rahmen einer experimentellen Colitis mit Wildtypmäusen zu vergleichen.

Die chemisch induzierte Natriumdextransulfat (DSS)-Colitis stellt ein etabliertes Mausmodell der Darmentzündung dar. Mittels klinischer Parameter, Histologie, Mini-Endoskopie und ELISA wurde das Ausmaß der Entzündung in einem chronischen und einem akuten Ansatz bestimmt. Zusätzlich wurde mit isolierten PMN Migrations-Untersuchungen in einer Transmigrationskammer (Boyden-Kammer) durchgeführt um die funktionellen und molekularen Auswirkungen der *Gpr43*-Defizienz zu untersuchen.

In der akuten DSS-Colitis wurde für die *Gpr43*^{-/-}-Mäuse eine stärkere Entzündung, gestützt durch den klinischen Verlauf und die erhöhten Zytokin-Parameter, festgestellt. Der Gesamteindruck deutete auf eine systemische Infektion hin, die einherging mit dem Tod aller Versuchstiere während der Experimentalphase. Histologische und endoskopische Untersuchungen zeigten jedoch weniger entzündliche Merkmale als bei den Vergleichstieren. In der chronischen DSS-Colitis wirkte die *Gpr43*-Defizienz protektiv auf den Verlauf der Erkrankung. Die erhobenen Parameter und Untersuchungen zeigten geringere Entzündungsparameter als bei den Wildtypmäusen.

In beiden Modellen war gleichermaßen auffällig, dass sich in den submukosalen Blutgefäßen Granulozytenkonglomerate ansammelten, während in der Submukosa selbst kaum PMNs zu finden waren. Ob eine geminderte Evasionsfähigkeit mit der Rezeptordefizienz in einen kausalen Zusammenhang gebracht werden kann, wurde

anschließend in Chemotaxisexperimenten untersucht: Die Migration *per se* war nicht beeinträchtigt, lediglich mit SCFA stimulierte Zellen zeigten ein reduziertes Migrationsvermögen. Des Weiteren wurde die Proteinkinase p38 als Gpr43-abhängiger Mediator der Aktivierungskaskade identifiziert und erstmals zeigt diese Arbeit, dass *L-Selektin-shedding* GPR43- und p38-abhängig induziert wird. Damit erscheint das Ausbleiben dieses Vorgangs ursächlich für die verminderten Evasion von PMN und stellt damit ein mögliches therapeutisches Ziel zur Durchbrechung der chronischen Entzündung dar.

6. Summary

Crohn's disease and Ulcerative colitis belong to the heterogeneous group of chronic inflammatory bowel disease (IBD). Little is known about their cause. However, genetic predisposition and environmental factors seem to play a role in disease development. They both contribute to a destroyed mucosal barrier leading to a chronic inflammatory state.

G-protein coupled receptor (GPR) 43 is highly expressed on polymorphonuclear neutrophils (PMN) within inflamed tissue. It selectively detects short chain fatty acids (SCFA) produced by anaerobic bacteria in the gut and initiates cell activation and migration processes. For this work *Gpr43*-deficient mice were created to compare with littermate controls.

The chemically induced dextrane sodium sulfate (DSS) colitis is a well established model for intestinal inflammation. Clinical parameters, cytokine ELISA, histology and mini-endoscopy determined disease activity in an acute and chronic setting. Additionally, chemotaxis experiments in a Boyden-chamber were performed to investigate functional and molecular responses of *Gpr43*-deficient PMNs.

In the acute setting a more severe inflammation could be detected in *Gpr43*^{-/-}-mice. Clinical findings and cytokine levels pointed towards a sepsis and eventually all of the mice died throughout the experimental phase. However, endoscopic and histological views revealed a less inflamed mucosa in these mice. In a chronic colitis setting, *Gpr43*-deficiency protected these mice against inflammation. All data indicated reduced disease activity.

Albeit the results in the experiments could not be more different, they both showed huge conglomerates of PMN in sub-mucosal blood vessels. Almost no granulocytes could be detected within the submucosal tissue. Whether receptor-deficiency could be linked to a reduced evasion-capacity was investigated in chemotaxis assays. Migration *per se* was not altered in *Gpr43*^{-/-}-PMNs while they lacked the ability to move towards a SCFA-stimulus. Furthermore it was demonstrated that the proteinkinase p38 is a downstream target of Gpr43-mediated activation. Additionally it was shown for the first time that L-Selectin-shedding is a GPR43- and thus p38-dependent mechanism. This leads to the assumption that abandoned L-Selectin-shedding is causal for reduced evasion and can be determined as a possible

therapeutic target to break through the vicious circle of chronic inflammation in the future.

7. Literaturverzeichnis

1. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004 May;126(6):1504-17.
2. Loftus CG, Loftus, E.V., Harmsen, W.S., Zinsmeister, A.R., Tremaine, W.J., Melton, L.J. 3rd, Sandborn, W.J. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;3(13):254-61.
3. Crohn BB, Ginzburg, L., Oppenheimer, G.D. Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. *JAMA*. 1984;251(1):73-9.
4. Baumgart DC, Sandborn, W.J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007;369(9573):1641-57.
5. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *NEJM*. 2002;347(6):417-29.
6. Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M, Hampe J, Krawczak M. Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat Rev Genet*. 2005 May;6(5):376-88.
7. Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut*. 2005;54(8):1182-93.
8. Sartor R. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1620-33.
9. Rosenstiel P, Sina, C., End, C., Renner, M., Lyer, S., Till, A., Hellmig, S., Nikolaus, S., Fölsch, U.R., Helmke, B., Autschbach, F., Schirmacher, P., Kioschis, P., Hafner, M., Poustka, A., Mollenhauer, J., Schreiber, S. Regulation of DMBT1 via NOD2 and TLR4 in intestinal epithelial cells modulates bacterial recognition and invasion. *J Immunol*. 2007;178(12):8203-11.
10. Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael JY, Lannoy V, Decobecq ME, et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Jul 11;278(28):25481-9.
11. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Mar 28;278(13):11312-9.
12. Binder V. Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18(3):463-79.
13. Douwes J, Travier, N., Huang, K., Cheng, S., McKenzie, J., Le Gros, G., von Mutius, E., Pearce, N. Lifelong farm exposure may strongly reduce the risk of asthma in adults. *Allergy*. 2007;62(10):1158-65.
14. Bach J. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *NEJM*. 2002;347(12):930-1.
15. Kurata JH, Kantor-Fish, S., Frankl, H., Godby, P., Vadheim, C.M. Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology*. 1992;102(6).
16. Houghton EA, Naish, J.M. Familial ulcerative colitis and ileitis. *Gastroenterologia*. 1958;89(2):65-74.
17. Kirsner JB, Spencer, J.A. Family Occurances of Ulcerative Colitis, Regional Enteritis and Ileocolitis. *Ann Intern Med*. 1963;59:133-44.

18. Thompson NP, Driscoll, R., Pounder, R.E., Wakefield, A.J. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ*. 1996;312(7023):95-6.
19. Meucci G, Vecchi, M., Torgano, G., Arrigoni, M., Prada, A., Rocca, F., Curzio, M., Pera, A., de Franchis, R. Familial aggregation of inflammatory bowel disease in northern Italy: a multicenter study. The Gruppo di Studio per le Malattie Infiammatorie Intestinali (IBD Study Group). *Gastroenterology*. 1992;103(2):514-9.
20. Orholm M, Binder, V., Sørensen, T.I., Rasmussen, L.P., Kyvik, K.O. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol*. 2000;35(10):1075-81.
21. Probert CS, Jayanthi, V., Hughes, A.O., Thompson, J.R., Wicks, A.C., Mayberry, J.F. Prevalence and family risk of ulcerative colitis and Crohn's disease: an epidemiological study among Europeans and south Asians in Leicestershire. *Gut*. 1993;34(11):1547-51.
22. Halme L, Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Lappalainen, M., Farkkila, M., Kontula, K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12(23):3688-72.
23. Russell RK, Satsangi, J. IBD: a family affair. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18(3):525-39.
24. Henckaerts L, Figueroa, C., Vermeire, S., Sans, M. The role of genetics in inflammatory bowel disease. *Curr Drug Targets*. 2008;9(5):361-8.
25. Williams CN, Kocher, K., Lander, E.S., Daly, M.J., Rioux, J.D. Using a genome-wide scan and meta-analysis to identify a novel IBD locus and confirm previously identified IBD loci. *Inflamm Bowel Dis*. 2002;6(8):375-81.
26. Cummings JR, Jewell, D.P. Clinical implications of inflammatory bowel disease genetics on phenotype. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11(1):56-1.
27. Annese V, Palmieri, O., Latiano, A., Ardizzone, S., Castiglione, F., Cottone, M., D'Incà, R., Gionchetti, P., Papi, C., Riegler, G., Vecchi, M., Andriulli, A. Frequency of NOD2/CARD15 variants in both sporadic and familial cases of Crohn's disease across Italy. An Italian Group for Inflammatory Bowel Disease Study. *Dig Liver Dis*. 2004;36(2):121-4.
28. Hampe J, Cuthbert, A., Croucher, P.J., Mirza, M.M., Mascheretti, S., Fisher, S., Frenzel, H., King, K., Hasselmeyer, A., MacPherson, A.J., Bridger, S., van Deventer, S., Forbes, A., Nikolaus, S., Lennard-Jones, J.E., Foelsch, U.R., Krawczak, M., Lewis, C., Schreiber, S., Mathew, C.G. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*. 2001;357(9272):1925-8.
29. Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez, A., Yamamoto-Furusho, J.K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(27):4280-8.
30. Nikolaus S, Bauditz, J., Gionchetti, P., Witt, C., Lochs, H., Schreiber, S. Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. *Gut*. 1998;42(4):470-6.
31. Mudter J, Neurath, M.F. Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(8):1016-23.
32. Zheng W, Rosenstiel, P., Huse, K., Sina, C., Valentonyte, R., Mah, N., Zeitlmann, L., Grosse, J., Ruf, N., Nürnberg, P., Costello, C.M., Onnie, C., Mathew, C., Platzer, M., Schreiber, S., Hampe, J. Evaluation of AGR2 and AGR3 as candidate genes for inflammatory bowel disease. *Genes Immun*. 2007;7(1):7-11.

33. Park SW, Zhen, G., Verhaeghe, C., Nakagami, Y., Nguyenvu, L.T., Barczak, A.J., Killeen, N., Erle, D.J. The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(17):6950-5.
34. Hampe J, Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M., Briggs, J., Günther, S., Prescott, N.J., Onnie, C.M., Häsler, R., Sipos, B., Fölsch, U.R., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, C.G., Krawczak, M., Schreiber, S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*. 2007;39(2):207-11.
35. Peeters M, Geypens, B., Claus, D., Nevens, H., Ghoo, Y., Verbeke, G., Baert, F., Vermeire, S., Vlietinck, R., Rutgeerts, P. Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1997;113(3).
36. Renner M, Bergmann, G., Krebs, I., End, C., Lyer, S., Hilberg, F., Helmke, B., Gassler, N., Autschbach, F., Bikker, F., Strobel-Freidekind, O., Gronert-Sum, S., Benner, A., Blaich, S., Wittig, R., Hudler, M., Ligtenberg, A.J., Madsen, J., Holmskov, U., Annese, V., Latiano, A., Schirmacher, P., Amerongen, A.V., D'Amato, M., Kioschis, P., Hafner, M., Poustka, A., Mollenhauer, J. DMBT1 confers mucosal protection in vivo and a deletion variant is associated with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2007;133(5):1499-509.
37. Yamamoto-Furusho JK, Uscanga, L.F., Vargas-Alarcón, G., Ruiz-Morales, J.A., Higuera, L., Cutiño, T., Rodríguez-Pérez, J.M., Villarreal-Garza, C., Granados, J. Clinical and genetic heterogeneity in Mexican patients with ulcerative colitis. *Hum Immunol*. 2003;64(1):119-23.
38. Stokkers PC, Reitsma, P.H., Tytgat, G.N., van Deventer, S.J. HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut*. 1999;45(3):395-401.
39. Duerr RH, Taylor, K.D., Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JJ, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006;314(5804):1461-3.
40. Franke A, Hampe, J., Rosenstiel, P., Becker, C., Wagner, F., Häsler, R., Little, R.D., Huse, K., Ruether, A., Balschun, T., Wittig, M., Elsharawy, A., Mayr, G., Albrecht, M., Prescott, N.J., Onnie, C.M., Fournier, H., Keith, T., Radelof, U., Platzer, M., Mathew, C.G., Stoll, M., Krawczak, M., Nürnberg, P., Schreiber, S. Systematic association mapping identifies NELL1 as a novel IBD disease gene. *PLoS ONE*. 2007;2(1):e691.
41. McGovern DP, Hysi, P., Ahmad, T., van Heel, D.A., Moffatt, M.F., Carey, A., Cookson, W.O., Jewell, D.P. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet*. 2005;14(10):1245-50.
42. Matsuzawa J, Sugimura, K., Matsuda, Y., Takazoe, M., Ishizuka, K., Mochizuki, T., Seki, S.S., Yoneyama, O., Bannai, H., Suzuki, K., Honma, T., Asakura, H. Association between K469E allele of intercellular adhesion molecule 1 gene and inflammatory bowel disease in a Japanese population. *Gut*. 2003;52(8):75-8.
43. Low JH, Williams, F.A., Yang, X., Cullen, S., Colley, J., Ling, K.L., Armuzzi, A., Ahmad, T., Neville, M.J., Dechairo, B.M., Walton, R., Lench, N.J., Jewell, D.P. Inflammatory bowel disease is linked to 19p13 and associated with ICAM-1. *Inflamm Bowel Dis*. 2004 10(3):173-81.
44. Sugimoto K. Role of STAT3 in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(33):5110-4.

45. Cario E, Podolsky, D.K. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun.* 2000;68(12):7010-7.
46. Kaser A, Lee, A.H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., Blumberg, R.S. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell.* 2008;134(5):743-56.
47. Fellermann K, Wehkamp, J., Herrlinger, K.R., Stange, E.F. Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003;15(6):627-34.
48. Zheng JJ, Zhu, X.S., Huangfu, Z., Gao, Z.X, Guo, Z.R., Wang, Z. Crohn's disease in mainland China: a systematic analysis of 50 years of research. *Chin J Dig Dis.* 2005;6(4):175-8.
49. Leong RW, Lau, J.Y., Sung, J.J. The epidemiology and phenotype of Crohn's disease in the Chinese population. *Inflamm Bowel Dis.* 2004;5(10):646-51.
50. Baumgart DC, Carding, S.R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet.* 2007;369(9573):1627-40.
51. Hampe J, Heymann, K., Krawczak, M., Schreiber, S. Association of inflammatory bowel disease with indicators for childhood antigen and infection exposure. *Int J Colorectal Dis.* 2003;18(5):413-7.
52. Gent AE, Hellier, M.D., Grace, R.H., Swarbrick, E.T., Coggon, D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet.* 1994;343(8900):766-7.
53. McCormick P, Manning, D. Chronic inflammatory bowel disease and the 'over-clean' environment: rarity in the Irish 'traveller' community. *Ir Med J.* 2001;94(7):203-4.
54. Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004;18(3):481-96.
55. McGrath J, McDonald, J.W., Macdonald, J.K. Transdermal nicotine for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2004.
56. Riordan AM, Ruxton, C.H., Hunter, J.O. A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars. *Eur J Clin Nutr.* 1998;52(4):229-38.
57. Sonntag B, Stolze, B., Heinecke, A., Luegering, A., Heidemann, J., Lebidz, P., Rijcken, E., Kiesel, L., Domschke, W., Kucharzik, T., Maaser, C. Preterm birth but not mode of delivery is associated with an increased risk of developing inflammatory bowel disease later in life. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(11):1385-90.
58. Lüllmann R. *Histologie Verstehen - Lernen - Nachschlagen.* 1 ed: Thieme Verlag; 2003.
59. Gill SR, Pop, M., Deboy ,R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., Nelson, K.E. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* 2006;312(5778):1355-9.
60. Frank DN, Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., Pace, N.R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(34):13780-5.
61. Ley RE, Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S., Schlegel, M.L., Tucker, T.A., Schrenzel, M.D., Knight, R., Gordon, J.I. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science.* 2008;320(5883):1647-51.
62. Frank DN, Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., Pace, N.R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;34(104):13780-5.
63. Rakoff-Nahoum S, Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 2004;118(2):229-41.

64. Maslowski KM, Vieira, A.T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H.C., Rolph, M.S., Mackay, F., Artis, D., Xavier, R.J., Teixeira, M.M., Mackay, C.R. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282-86.
65. Treem WR, Ahsan, N., Shoup, M., Hyams, J.S. Fecal short-chain fatty acids in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1994;18(2):159-64.
66. Cummings JH, Kong, S.C. Probiotics, prebiotics and antibiotics in inflammatory bowel disease. *Novartis Found Symp*. 2004;263:99-111.
67. Cook SI, Sellin, J.H. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 1998;12(6):499-507.
68. Cummings JH. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut*. 1981;22(9):763-79.
69. Ruppin H, Bar-Meir, S., Soergel, K.H., Wood, C.M., Schmitt, M.G. Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology*. 1980;78(6):1500-7.
70. Wong JM, de Souza, R., Kendall, C.W., Emam, A., Jenkins, D.J. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40(3):235-43.
71. Cox MA, Jackson, J., Stanton, M., Rojas-Triana, A., Bober, L., Laverty, M., Yang, X., Zhu, F., Liu, J., Wang, S., Monsma, F., Vassileva, G., Maguire, M., Gustafson, E., Bayne, M., Chou, C.C., Lundell, D., Jenh, C.H. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. *World J Gastroenterol*. 2009;44(15):5549-57.
72. Inan MS, Rasoulpour, R.J., Yin, L., Hubbard, A.K., Rosenberg, D.W., Giardina, C. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology*. 2000;118(4):724-34.
73. Tedelind S, Westberg, F., Kjerrulf, M., Vidal, A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13(20):2816-32.
74. Cavaglieri CR, Nishiyama, A., Fernandes, L.C., Curi, R., Miles, E.A., Calder, P.C. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life sciences*. 2003;73(13):1683-90.
75. Schaubert J, Svanholm, C., Termén, S., Iffland, K., Menzel, T., Scheppach, W., Melcher, R., Agerberth, B., Lührs, H., Gudmundsson, G.H. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut*. 2003;52(5):735-41.
76. Galvez J, Rodríguez-Cabezas, M.E., Zarzuelo, A. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res*. 2005;49(6):601-8.
77. Breuer RI, Soergel, K.H., Lashner, B.A., Christ, M.L., Hanauer, S.B., Vanagunas, A., Harig, J.M., Keshavarzian, A., Robinson, M., Sellin, J.H., Weinberg, D., Vidican, D.E., Flemal, K.L., Rademaker, A.W. Short chain fatty acid rectal irrigation for left-sided ulcerative colitis: a randomised, placebo controlled trial. *Gut*. 1997;40(4):485-91.
78. Tang Y, Chen, Y., Jiang, H., Robbins, G.T., Nie, D. G-protein-coupled receptor for short-chain fatty acids suppresses colon cancer. *Int J Canc*. 2011;128(4):847-56.
79. Swidsinski A, Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., Lochs, H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002;122(1):44-54.
80. Meyer-Hoffert U, Hornef, M.W., Henriques-Normark, B., Axelsson, L.G., Midtvedt, T., Pütsep, K., Andersson, M. Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut*. 2008;57(6):764-71.
81. Al-Sadi R, Boivin, M., Ma, T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front Biosci*. 2009;14:2765-78.

82. Chiba H, Kojima, T., Osanai, M., Sawada, N. The significance of interferon-gamma-triggered internalization of tight-junction proteins in inflammatory bowel disease. *Sci STKE*. 2006;316:pe1.
83. Schneeberger EE, Lynch, R.D. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;286(6):C1213-28.
84. Liévin-Le Moal V, Servin, A.L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(2):315-37.
85. Rosenstiel P, Sina, C., Franke, A., Schreiber, S. Towards a molecular risk map--recent advances on the etiology of inflammatory bowel disease. *Semin Immunol*. 2009;21(6):334-45.
86. Strober W, Fuss, I., Mannon, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2007;117(3):514-21.
87. Xavier RJ, Podolsky, D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448(7152):427-34.
88. Strober W, Murray, P.J., Kitani, A., Watanabe, T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunology*. 2006;6(1):9-20.
89. Ruiz PA, Shkoda, A., Kim, S.C., Sartor, R.B., Haller, D. IL-10 gene-deficient mice lack TGF-beta/Smad-mediated TLR2 degradation and fail to inhibit proinflammatory gene expression in intestinal epithelial cells under conditions of chronic inflammation. *Annual N Y Acad Sci*. 2006;1072:389-94.
90. Nenci A, Becker, C., Wullaert, A., Gareus, R., van Loo, G., Danese, S., Huth, M., Nikolaev, A., Neufert, C., Madison, B., Gumucio, D., Neurath, M.F., Pasparakis, M. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature*. 2007;446(7135):557-61.
91. Baumgart DC, Metzke, D., Schmitz, J., Scheffold, A., Sturm, A., Wiedenmann, B., Dignass, A.U. Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut*. 2005;54(2):228-36.
92. Zaph C, Troy, A.E., Taylor, B.C., Berman-Booty, L.D., Guild, K.J., Du, Y., Yost, E.A., Gruber, A.D., May, M.J., Greten, F.R., Eckmann, L., Karin, M., Artis, D. Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature*. 2007;446(7135).
93. Schreiber S, Nikolaus, S., Hampe, J., Hämling, J., Koop, I., Groessner, B., Lochs, H., Raedler, A. Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. *Lancet*. 1999;353(9151):459-61.
94. Deshmane SL, Kremlev, S., Amini, S., Sawaya, B.E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(6):313-26.
95. Callewaere C, Banisadr, G., Rostène, W., Parsadaniantz, S.M. Chemokines and chemokine receptors in the brain: implication in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol*. 2007;38(3):355-63.
96. Rollins B. Chemokines. *Blood*. 1997;3(90):909-28.
97. Vinolo MA, Rodrigues, H.G., Hatanaka, E., Hebeda, C.B., Farsky, S.H., Curi, R. Short chain fatty acids stimulate migration of neutrophils to inflammatory site. *Clin Sci* 2009;117(9):331-8.
98. Kucharzik T, Hudson JT, 3rd, Luger A, Abbas JA, Bettini M, Lake JG, et al. Acute induction of human IL-8 production by intestinal epithelium triggers neutrophil infiltration without mucosal injury. *Gut*. 2005 Nov;54(11):1565-72.
99. Hyduk SJ, Chan, J.R., Duffy, S.T., Chen, M., Peterson, M.D., Waddell, T.K., Digby, G.C., Szaszi, K., Kapus, A., Cybulsky, M.I. Phospholipase C, calcium, and calmodulin

- are critical for alpha4beta1 integrin affinity up-regulation and monocyte arrest triggered by chemoattractants. *Blood*. 2007;109(1):176-84.
100. Becker MD, O'Rourke, L.M., Blackman, W.S., Planck, S.R., Rosenbaum, J.T. Reduced leucocyte migration, but normal rolling and arrest, in interleukin-8 receptor homologue knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(7):1812-7.
 101. Sunil Y, Ramadori, G., Raddatzc, D. Influence of NFkappaB inhibitors on IL-1beta-induced chemokine CXCL8 and -10 expression levels in intestinal epithelial cell lines: glucocorticoid ineffectiveness and paradoxical effect of PDTC. *Int J Colorectal Dis*. 2010;25(3):323-33.
 102. de Boer WI, Alagappan, V.K., Sharma, H.S. Molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: potential targets for therapy. *Cell Biochem Biophys*. 2007;47(1):131-48.
 103. Kucharzik T HJr, Lügering A, Abbas JA, Bettini M, Lake JG, Evans ME, Ziegler TR, Merlin D, Madara JL, Williams IR. Acute induction of human IL-8 production by intestinal epithelium triggers neutrophil infiltration without mucosal injury. *Gut*. 2005;54(11):1565-72.
 104. Zarbock A, Ley, K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol*. 2008;172(1):1-7.
 105. Dwir O, Kansas GS, Alon R. Cytoplasmic anchorage of L-selectin controls leukocyte capture and rolling by increasing the mechanical stability of the selectin tether. *J Cell Biol*. 2001 October 1, 2001;155(1):145-56.
 106. Simon SI, Burns AR, Taylor AD, Gopalan PK, Lynam EB, Sklar LA, et al. L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18) beta 2-integrin. *J Immunol*. 1995 August 1, 1995;155(3):1502-14.
 107. Kahn J, Walcheck, B., Migaki, G.I., Jutila, M.A., Kishimoto, T.K. Calmodulin regulates L-selectin adhesion molecule expression and function through a protease-dependent mechanism. *Cell* 1998;92(6):809-18.
 108. Arribas J, Coodly, L., Vollmer, P., Kishimoto, T.K., Rose-John, S., Massagué, J. Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(19):11376-82.
 109. Laudanna C, Constantin G, Baron P, Scarpini E, Scarlato G, Cabrini G, et al. Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule. *J Biol Chem*. 1994 February 11, 1994;269(6):4021-6.
 110. Brenner B, Gulbins E, Schlottmann K, Koppenhoefer U, Busch GÄ, Walzog B, et al. L-Selectin activates the Ras pathway via the tyrosine kinase, p56lck . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 December 24, 1996;93(26):15376-81.
 111. Waddell TK, Fialkow L, Chan CK, Kishimoto TK, Downey GP. Signaling Functions of L-selectin. *J Biol Chem*. 1995 June 23, 1995;270(25):15403-11.
 112. Bokoch GM. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*. 1995 September 1, 1995;86(5):1649-60.
 113. Nilsson NE, Kotarsky K, Owman C, Olde B. Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003 Apr 18;303(4):1047-52.
 114. Naccache PH, Faucher, N., Caon, A.C., McColl, S.R. Propionic acid-induced calcium mobilization in human neutrophils. *J Cell Physiol*. 1988;136(1):118-24.
 115. Yonezawa T, Kobayashi, Y., Obara, Y. Short-chain fatty acids induce acute phosphorylation of the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27

- pathway via GPR43 in the MCF-7 human breast cancer cell line. Cellular signalling. 2007 Jan;19(1):185-93.
116. Ni J, Chen, S.F., Hollander, D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut*. 1996;39(2):234-41.
 117. Okayasu I, Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., Nakaya, R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990;98(3):694-702.
 118. Mähler M, Bristol, I.J., Leiter, E.H., Workman, A.E., Birkenmeier, E.H., Elson, C.O., Sundberg, J.P. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am J Physiol*. 1998;274(3):544-51.
 119. Wirtz S, Neufert, C., Weigmann, B., Neurath, M.F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*. 2007;2(3):541-6.
 120. D'Haens G, Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Geboes, K., Hanauer, S.B., Irvine, E.J., Lémann, M., Marteau, P., Rutgeerts, P., Schölmerich, J., Sutherland, L.R. A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2007;132(2):763-86.
 121. Siegmund B, Lehr, H.A., Fantuzzi, G., Dinarello, C.A. IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(23):13249-54.
 122. Becker C FM, Wirtz S, Nikolaev A, Kiesslich R, Lehr HA, Galle PR, Neurath MF. In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy. *Gut*. 2005;54(7):950-4.
 123. Hahn D, Illisson R, Metspalu A, Sterchi EE. Human N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid hydrolase (human meprin): genomic structure of the alpha and beta subunits. *Biochem J*. 2000 Feb 15;346 Pt 1:83-91.
 124. Borland G, Murphy, G., Ager, A. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits shedding of L-selectin from leukocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(5):2810-5.
 125. Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1990;48(8):579-82.
 126. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951 Nov;193(1):265-75.
 127. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
 128. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*. 1962(115):453-66.
 129. Wirtz S, Neurath, M.F. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(11):1073-83.
 130. Fukata M, Michelsen, K.S., Eri, R., Thomas, L.S., Hu, B., Lukasek, K., Nast, C.C., Lechago, J., Xu, R., Naiki, Y., Soliman, A., Arditi, M., Abreu, M.T. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(5):1055-65.
 131. Groux H, O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S, de Vries, J.E., Roncarolo, M.G. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389(6652):737-42.
 132. Takeda K, Clausen, B.E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Förster, I., Akira, S. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*. 1999;10(1):39-49.

133. Panwala CM, Jones, J.C., Viney, J.L. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol.* 1998;161(10):5733-44.
134. Zhu S, Ashok, M., Li, J., Li, W., Yang, H., Wang, P., Tracey, K.J., Sama, A.E., Wang, H. Spermine protects mice against lethal sepsis partly by attenuating surrogate inflammatory markers. *Mol Med.* 2009;15(7-8):275-82.
135. Finnerty CC, Przkora, R., Herndon, D.N., Jeschke, M.G. Cytokine expression profile over time in burned mice. *Cytokine.* 2009;45(1):20-5.
136. Sina C, Gavriloova, O., Förster, M., Till, A., Derer, S., Hildebrand, F., Raabe, B., Chalaris, A., Scheller, J., Rehmann, A., Franke, A., Ott, S., Häslner, R., Nikolaus, S., Fölsch, U.R., Rose-John, S., Jiang, H.P., Li, J., Schreiber, S., Rosenstiel, P. G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *Journal of Immunology.* 2009;183(11):7514-22.
137. Gouni-Berthold I, Baumeister, B., Wegel, E., Berthold, H.K., Vetter, H., Schmidt, C. Neutrophil-elastase in chronic inflammatory bowel disease: a marker of disease activity? *Hepatology.* 1999;46(28):2315-20.
138. Castaneda FE, Walia, B., Vijay-Kumar, M., Patel, N.R., Roser, S., Kolachala, V.L., Rojas, M., Wang, L., Oprea, G., Garg, P., Gewirtz, A.T., Roman, J., Merlin, D., Sitaraman, S.V. Targeted deletion of metalloproteinase 9 attenuates experimental colitis in mice: central role of epithelial-derived MMP. *Gastroenterology.* 2005;129(6):1991-2008.
139. Sacco RE, Hutto, D.L., Waters, W.R., Xiasong, L., Kehrli, M.E., Zuckermann, F.A., Wannemuehler, M.J. Reduction in inflammation following blockade of CD18 or CD29 adhesive pathways during the acute phase of a spirochetal-induced colitis in mice. *Microb Pathog.* 2000;29(5):289-99.
140. Baert FJ, D'Haens GR, Peeters M, Hiele MI, Schaible TF, Shealy D, et al. Tumor necrosis factor alpha antibody (infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology.* 1999 Jan;116(1):22-8.
141. Murthy SN, Anania, T., Clearfield, H.R. Azathioprine reduces extravasation and neutrophil trafficking in immune complex-mediated inflammation in the rat colon. *Agents Actions.* 1991;34(1-2):244-6.
142. Edens HA, Levi, B.P., Jaye, D.L., Walsh, S., Reaves, T.A., Turner, J.R., Nusrat, A., Parkos, C.A. Neutrophil transepithelial migration: evidence for sequential, contact-dependent signaling events and enhanced paracellular permeability independent of transjunctional migration. *J Immunol.* 2002;169(1):476-86.
143. Bongartz T, Sutton, A.J., Sweeting, M.J., Buchan, I., Matteson, E.L., Montori, V. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA.* 2006;295(19):2275-85.
144. Edwards JC, Sedgwick, A.D., Willoughby, D.A. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *J Pathol.* 1981;134(2):147-56.
145. Nick JA, Avdi NJ, Young SK, Lehman LA, McDonald PP, Frasch SC, et al. Selective activation and functional significance of p38alpha mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils. *J Clin Invest.* 1999 Mar;103(6):851-8.
146. Heit B, Tavener S, Raharjo E, Kubes P. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J Cell Biol.* 2002 Oct 14;159(1):91-102.
147. Hollenbach E, Vieth, M., Roessner, A., Neumann, M., Malfertheiner, P., Naumann, M. Inhibition of RICK/nuclear factor-kappaB and p38 signaling attenuates the

- inflammatory response in a murine model of Crohn disease. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(15):14981-8.
148. Nishimura T, Andoh, A., Nishida, A., Shioya, M., Koizumi, Y., Tsujikawa, T., Fujiyama, Y. FR167653, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, aggravates experimental colitis in mice. *World J Gastroenterol*. 2008;14(38):5851-6.
 149. Parkos CA. Cell adhesion and migration. I. Neutrophil adhesive interactions with intestinal epithelium. *Am J Physiol*. 1997 Oct;273(4 Pt 1):G763-8.
 150. Hafezi-Moghadam A, Ley, K. Relevance of L-selectin shedding for leucocyte rolling in vivo. *J Exp Med*. 1999;189(6):939-48.
 151. Hafezi-Moghadam A, Thomas, K.L., Prorock, A.J., Huo, Y., Ley, K. L-selectin shedding regulates leucocyte recruitment. *J Exp Med*. 2001;193(7):863-72.
 152. Smalley DM, Ley, K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med*. 2005;9(2):255-66.
 153. Arbonés ML, Ord, D.C., Ley, K., Ratech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Capon, D.J., Tedder, T.F. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity*. 1994;1(4):247-60.
 154. Pizcueta P, Luscinskas, F.W. Monoclonal antibody blockade of L-Selectin inhibits mononuclear leukocyte recruitment to inflammatory sites. *Am J Pathol*. 1994;145(2):461-9.
 155. Tedder TF, Steeber, D.A., Pizcueta, P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J Exp Med*. 1995;181(6):2259-64.
 156. Chalaris A, Adam, N., Sina, C., Rosenstiel, P., Lehmann-Koch, J., Schirmacher, P., Hartmann, D., Cichy, J., Gavriloova, O., Schreiber, S., Jostock, T., Matthews, V., Häslner, R., Becker, C., Neurath, M.F., Reiss, K., Saftig, P., Scheller, J., Rose-John, S. Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp Med*. 2010;8(207):1617-24.
 157. Bollrath J, Pheesse, T.J., von Burstin, V.A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, O., Schwitalla, S., Matthews, V., Schmid, R.M., Kirchner, T., Arkan, M.C., Ernst, M., Greten, F.R. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2009;2(15):91-102.
 158. Ghosh S, Goldin E, Gordon FH, Malchow HA, Rask-Madsen J, Rutgeerts P, et al. Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2003 Jan 2;348(1):24-32.
 159. Shimoyama T, Sawada K, Hiwatashi N, Sawada T, Matsueda K, Munakata A, et al. Safety and efficacy of granulocyte and monocyte adsorption apheresis in patients with active ulcerative colitis: a multicenter study. *J Clin Apher*. 2001;16(1):1-9.
 160. Morohoshi Y, Matsuoka, K., Chinen, H., Kamada, N., Sato, T., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Inoue, N., Takaishi, H., Ogata, H., Iwao, Y., Hibi, T. Inhibition of neutrophil elastase prevents the development of murine dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Gastroenterol*. 2006;41(4):318-24.
 161. Moreno SE, Alves-Filho, J.C., Alfaya, T.M., da Silva, J.S., Ferreira, S.H., Liew, F.Y. IL-12, but not IL-18, is critical to neutrophil activation and resistance to polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture. *J Immunol*. 2006;177(5):3218-24.
 162. Neurath MF, Fuss, I., Kelsall, B.L., Stüber, E., Strober, W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med*. 1995;182(5):1281-90.
 163. Mannon PJ, Fuss, I.J., Mayer, L., Elson, C.O., Sandborn, W.J., Present, D., Dolin, B., Goodman, N., Groden, C., Hornung, R.L., Quezado, M., Yang, Z., Neurath, M.F., Salfeld, J., Veldman, G.M., Schwertschlag, U., Strober, W. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2004;351(20):2069-79.

164. Fieschi C, Allez, M., Casanova, J.L. High risk of infectious disease caused by salmonellae and mycobacteria infections in patients with Crohn disease treated with anti-interleukin-12 antibody. *Clin Infect Dis.* 2005;40(9):1381.
165. MacLennan C, Lammas, D.A., Kumararatne, D.S. Anti-interleukin-12 antibody treatment for Crohn disease: potential risk of invasive disease due to mycobacteria and salmonellae infection. *Clin Infect Dis.* 2005;9(40):1381-2.
166. Schreiber S, Feagan B, D'Haens G, Colombel JF, Geboes K, Yurcov M, et al. Oral p38 mitogen-activated protein kinase inhibition with BIRB 796 for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006 Mar;4(3):325-34.

8. Anhang – verwendete Materialien

8.1. Verwendete Puffer, Lösungen und Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit A. bidest. angesetzt.

Tab. 9: Bezeichnung und Zusammensetzung verwendeter Puffer, Lösungen und Medien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x DNA-Ladepuffer	50% (v/v) Glycerol, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) Xylencyanol
25x TAE	1 M Tris/HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA, 500 mM Essigsäure
2x DLB	20 mM Tris/HCl (pH 7,4), 2% (w/v) SDS
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,4% (w/v) SDS
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4% (w/v) SDS
5x PBS	40 g/l NaCl, 5,8 g/l Na ₂ HPO ₄ , 1 g/l KH ₂ PO ₄ , 1 g/l KCl
5x SDS-Ladepuffer	312,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10% (w/v) SDS, 50%(v/v) Glycerol, 10% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau
Anodenpuffer 1	30 mM Tris-Base, 20% (v/v) Methanol
Anodenpuffer 2	300 mM Tris-Base, 20% (v/v) Methanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base, 20%(v/v) Methanol, 40 mM 6-Amino-Caprinsäure
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 2% (w/v) SDS, 0,7% (v/v) β-Mercaptoethanol
TE (pH 7,6; pH 8,0)	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA
TTBS	20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween20

8.2. **Verwendete Chemikalien, Zusätze und Enzyme**

Tab. 10: *Bezeichnung und Name des Herstellers verwendeter Chemikalien, Zusätze und Enzyme.*

Bezeichnung	Hersteller
1x PBS	PAA Laboratories, Linz
50x TAE Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30:0,8)	BioRad, München
Agarose	Eurogentec, Köln
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA-Lösung (10mg/ml)	NEB, Bad Schwalbach
Butyrat	Sigma, Steinheim
Cybersafe	BioRad, München
DEPC	Sigma, München
Dextran Sodium Sulfat, 40kDa	TdB consultancy, Schweden
DMSO	Sigma, München
dNTP Set (100 mM-Lösung)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Calbiochem, Bad Soden
Eosin	Roth
Ethanol (p.a.)	Merck, Darmstadt
fMLP	Sigma, München
GM6001	Calbiochem
Hämalaun	Roth
HCl	Merck, Darmstadt
Hepes	Sigma, München
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Darmstadt
KC	Sigma, München
KCl	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver (MMP)	BioRad, München
Methanol	Merck, Darmstadt
MgSO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Sigma, München

Bezeichnung	Hersteller
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin	Sigma, München
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma, Taufkirchen
PMA	Sigma, Steinheim
Propionat	Sigma, Steinheim
Proteinmarker Precision Plus Protein™ Dual Color	Bio-Rad, München
RPMI-1640 Medium	PAA Laboratories, Linz
SB203580	Sigma, Steinheim
SDS	Calbiochem, Bad Soden
SmartLadder DNA Marker	Eurogentec, Köln
Streptomycin	Sigma, Steinheim
TGS protein electrophoresis buffer 10x Tris/Glycin/SDS	BioRad, München
Thioglycollat	Sigma, Steinheim
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypan-Blau-Lösung	Sigma, München
Trypsin/EDTA (1X)	Invitrogen, Karlsruhe
Tween20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (30% Lösung)	Sigma, München
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma, München

Tab. 11: *Verwendete Antikörper.*

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-GPR43	1:500	Santa Cruz Biotechnology
Anti-L-Selektin-FITC	1:1000	Acris Antibodies, Herford
Anti-Ly6G	1:100	Abcam, Cambridge
Anti-Ly6G-FITC	1:500	Hbt Biotechnology, Uden
Anti-mouse	1:250	Vector Lab, Burligame
Anti-pp38	1:200	Cell Signaling Technologies, Frankfurt
Anti-rabbit	1:250	Vector Lab, Burligame
Anti-β-Aktin	1:1000	Cell Signaling Technologies, Frankfurt

Tab. 12: *Bezeichnung und Name des Herstellers verwendeter Geräte.*

Gerät	Hersteller
Aida-Vet™ Videoendoskopie	Karl Storz, Tuttlingen
Axiocam HrC	Zeiss, Jena
Axiomager 21 Mikroskop	Zeiss, Jena
Boyden Kammer	Neuroprobe, Gaitersburg
FACScalibur Flow Cytometer	Becton-Dickinson, San Jose
Nanodrop 2000	Nanodrop, Wilmington

8.3. *Verwendete Kits*

Tab. 13: *Bezeichnung und Name des Herstellers verwendeter Kits.*

Bezeichnung	Hersteller
Chromogen Kit	Vector Lab, Burligame
DNase I	Qiagen, Hilden
Dual-Luciferase-Assay	Promega, Mannheim
ECL-PLUS	Amersham Biosciences, Freiburg

Hämocult Test	Beckmann Coulter, Krefeld-Fischeln
MiniElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
MiniElute PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
MPO Acitivity Assay	Hbt Biotechnology, Uden
Murine KC ELISA Kit	BioSource, Karlsruhe
Platinum Taq DNA polymerase high fidelity Kit	Invitrogen, Karlsruhe
QIASHredder Homogenizer Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TNF- α ELISA Kit	BioSource, Karlsruhe
Wizard SV Genomic DNA Purification System	Promega, Mannheim

9. Danksagungen

Einer Reihe von Personen möchte ich an dieser Stelle danken, ohne deren unermüdliches Vorantreiben, konstruktive Kritik und Kommentare diese Dissertation nie entstanden wäre.

Zunächst danke ich Herrn Prof. Schreiber, Direktor der I. Med. Klinik, UK-SH, der Christian-Albrechts-Universität (CAU) Kiel und Direktor des Institut für klinische Molekularbiologie (IKMB), für die Überlassung dieses anspruchsvollen Promotionsthemas.

Herrn Prof. Rosenstiel danke ich für die stets hervorragende fachliche Betreuung und Beratung als Doktorvater während der Experimentalphase sowie in der anschließenden Anfertigung der Dissertationsschrift.

Herrn Dr. Sina danke ich für die direkte Betreuung, viel Geduld und das dauerhafte Engagement, welches Grundlage für diese Promotion war. Großer Dank gilt auch dem ganzen Team der Abteilung „Zellbiologie“ des IKMB (insbesondere Gunnar Jacobs, Andreas Till, Simone Lipinski, Olga Gavrilova, Konrad Aden, Sven Künzel sowie Maren Reffemann und Tanja Kacksteen), die mich mit ihrer fachlichen Kompetenz auf den ersten Schritten in der neuen Welt der Wissenschaft begleitet (und Fehltritte verziehen) haben.

Für die ständige Begleitung, Unterstützung und Motivation während des Studiums und der Promotionszeit sei an dieser Stelle meinen Eltern, Ulrike und Klaus Förster, der größte Dank ausgesprochen.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Matti Förster

Geburtsdatum: 18.4.1984 in Hamburg

Ausbildung und Studium:

1998 – 2003 Abitur Humboldt-Schule Kiel

2003 – 2004 Zivildienst Lubinus Clinicum, Kiel

2004 – 2010 Studium der Humanmedizin CAU Kiel

2005 – 2010 Promotion am Institut für klinische Molekularbiologie, Kiel

2009 – 2010 Praktisches Jahr und Approbation

Veröffentlichungen:

Artikel

J Immunol. 2009 Dec 1:183(11):7514-22. Epub 2009 Nov 16. *G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation.* Sina C, Gavrilova O, **Förster M**, Till A, Derer S, Hildebrand F, Raabe B, Chalaris A, Scheller J, Rehmann A, Franke A, Ott S, Häsler R, Nikolaus S, Fölsch UR, Rose-John S, Jiang HP, Li J, Schreiber S, Rosenstiel P.

Vorträge

Leiden International Medical Students Conference, Mar 13-14, 2009. *Gpr43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation.*

Poster

Annual Meeting des Exzellenzclusters für Entzündungsforschung, 2009. *G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation.* Sina C, Gavrilova O, **Förster M**, Till A, Chalaris A, Scheller J, Rose-John S, Schreiber S, Rosenstiel P.