

Aus dem Institut für Klinische Molekularbiologie
(Direktoren: Prof. Dr. Andre Franke, Prof. Dr. Philip Rosenstiel, Prof. Dr. Stefan Schreiber)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

DIE BEDEUTUNG DES *DISC LARGE*
HOMOLOG (DLG) 5 GENS IM
MURINEN INTESTINALEN EPITHEL
BEI EXPERIMENTELLER
DARMENTZÜNDUNG

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

vorgelegt von

FRIEDERIKE HILDEBRAND

aus **Köln**

Kiel 2016

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Philip Rosenstiel

Institut für Klinische Molekularbiologie

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Alexander Arlt

Klinik für Innere Medizin I mit den Schwerpunkten
Gastroenterologie, Hepatologie, Ernährungs- und
Altersmedizin

Tag der mündlichen Prüfung:

24.05.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

23.03.2017

gez.: Prof. Dr. Johann Roeder

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abkürzungsverzeichnis | I |
| Nomenklatur von Genen und Proteinen | IV |
| Abbildungsverzeichnis | V |
| Tabellenverzeichnis..... | VI |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Morbus Crohn und Colitis ulcerosa | 1 |
| 1.1.1 Definition und Ätiologie | 1 |
| 1.1.2 Klinik..... | 1 |
| 1.2 Pathophysiologie von CED: Barrierestörung | 2 |
| 1.2.1 Physiologie und Störungen der Barrierefunktion..... | 2 |
| 1.2.1.1 Das Epithel und seine Zellen..... | 2 |
| 1.2.1.1.1 Die Epithelzellen | 2 |
| 1.2.1.1.2 Die Paneth-Zellen..... | 3 |
| 1.2.1.1.3 Die Becherzellen..... | 3 |
| 1.2.1.2 Adhäsionskomplexe | 4 |
| 1.2.2 Genomweite Assoziationsstudien | 4 |
| 1.2.2.1 NOD2 | 5 |
| 1.2.2.2 ATG16L1 | 6 |
| 1.2.2.3 Interleukin-23R | 7 |
| 1.2.3 DLG5..... | 8 |
| 1.3 Zielsetzung | 9 |
| 2 Material und Methoden | 10 |
| 2.1 Tiere | 10 |
| 2.1.1 Generierung der <i>Dlg5^{AIEC}</i> Mäuse | 10 |
| 2.1.2 Tierhaltung | 11 |
| 2.1.3 Organisierung aus den Versuchstieren..... | 11 |
| 2.1.4 Basale Phänotypisierung | 13 |
| 2.1.4.1 Gewichtsbestimmung | 13 |
| 2.1.4.2 Kolonlänge | 13 |
| 2.1.4.3 Histologische Schnitte..... | 13 |
| 2.1.5 Induktion einer chronischen Colitis durch Gabe von DSS | 13 |
| 2.1.6 Disease Activity Index | 14 |
| 2.1.7 Histopathologische Analyse | 15 |
| 2.1.7.1 Hämatoxylin-Eosin Färbungen | 15 |
| 2.1.7.2 TUNEL-Färbungen | 15 |
| 2.1.7.3 Histologischer Score | 16 |
| 2.1.7.4 Epithelverlust | 17 |
| 2.2 Zellbiologische Methoden..... | 17 |
| 2.2.1 Zelllinie | 18 |
| 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl | 18 |
| 2.2.3 Zellkultur und Transfektion von eukaryotischen Zellen mit siRNA..... | 18 |
| 2.2.4 Isolierung primärer muriner Darmepithelzellen..... | 20 |
| 2.3 Molekularbiologische Methoden..... | 21 |
| 2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure | 21 |
| 2.3.2 Isolierung von genomischer DNA aus Mäuseschwänzen | 21 |
| 2.3.3 Genotypisierungs-PCR..... | 21 |
| 2.3.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus intestinalen Epithelzellen..... | 22 |
| 2.3.5 cDNA-Synthese..... | 23 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 2.3.6 | Semiquantitative <i>reverse transcriptase</i> PCR (sRT-PCR) | 24 |
| 2.3.7 | Agarose-Gelelektrophorese | 25 |
| 2.3.8 | Quantitative <i>real-time</i> PCR (Taqman-PCR) | 25 |
| 2.4 | Biochemische Methoden | 26 |
| 2.4.1 | Herstellung von Gesamtproteinlysaten aus Zellen | 26 |
| 2.4.2 | Proteinkonzentrationsbestimmung | 27 |
| 2.4.3 | Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen..... | 27 |
| 2.4.4 | Immobilisierung von Proteinen durch Elektrotransfer (Westernblot)..... | 28 |
| 2.4.5 | Immundetektion von Proteinen | 29 |
| 2.4.6 | Zytokinbestimmungen..... | 29 |
| 2.4.6.1 | <i>Keratinocyte chemoattractant</i> ELISA..... | 29 |
| 2.4.6.2 | Multiplex ELISA..... | 30 |
| 2.5 | Statistik..... | 31 |
| 3 | Ergebnisse | 32 |
| 3.1 | Züchtung der konditionalen Knockout Maus <i>Dlg5^{ΔIEC}</i> | 32 |
| 3.1.1 | Nachweis der gewebespezifischen Deletion von <i>Dlg5</i> in den <i>Dlg5^{ΔIEC}</i> Mäusen .. | 33 |
| 3.2 | Basale Phänotypisierung | 35 |
| 3.2.1 | Gewichtsbestimmung | 35 |
| 3.2.2 | Kolonlänge | 35 |
| 3.2.3 | Histologische Untersuchung | 36 |
| 3.3 | Induktion einer Colitis bei <i>Dlg5^{ΔIEC}</i> und Wildtyp Mäusen mittels DSS-Gabe | 37 |
| 3.3.1 | Klinischer Befund im DSS-Experiment..... | 37 |
| 3.3.1.1 | Überlebenskurve..... | 37 |
| 3.3.1.2 | Gewichtsverlauf | 38 |
| 3.3.1.3 | Disease Activity Index | 40 |
| 3.3.2 | Befunde der <i>ex vivo</i> Untersuchungen im DSS-Experiment | 41 |
| 3.3.2.1 | Untersuchung der Organpräparate im DSS-Experiment..... | 41 |
| 3.3.2.1.1 | Kolonlänge..... | 41 |
| 3.3.2.1.2 | Zoekungewicht | 42 |
| 3.3.2.1.3 | Milzgewicht | 42 |
| 3.3.2.1.4 | Lebergewicht | 42 |
| 3.3.2.2 | Histologische Untersuchungen von Gewebeproben im DSS-Experiment... | 43 |
| 3.3.2.3 | Epithelverlust | 45 |
| 3.3.2.4 | TUNEL Färbung | 46 |
| 3.3.2.5 | Multiplex Analysen | 47 |
| 3.3.2.5.1 | Interleukin-1 β | 48 |
| 3.3.2.5.2 | Interleukin-6 | 48 |
| 3.3.2.5.3 | <i>Keratinocyte chemoattractant</i> (KC) | 48 |
| 3.3.2.5.4 | Interleukin-10 | 48 |
| 3.3.2.5.5 | Tumornekrosefaktor- α | 49 |
| 3.3.2.5.6 | Interferon- γ | 49 |
| 3.3.2.5.7 | Makrophagen-Inflammatorisches Protein-1 α | 49 |
| 3.3.2.5.8 | ELISA..... | 51 |
| 3.3.2.6 | Taqman-Analysen zur Genexpression von Zytokinen | 51 |
| 3.3.2.6.1 | Interleukin-1 β | 51 |
| 3.3.2.6.2 | Interleukin-6 | 52 |
| 3.3.2.6.3 | <i>Keratinocyte chemoattractant</i> | 52 |
| 3.3.2.6.4 | Tumornekrosefaktor- α | 52 |
| 3.3.3 | Bestimmung von phosphoryliertem ERK in siRNA gegen DLG5 behandelten HeLa Zellen..... | 54 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4 | Diskussion | 55 |
| 4.1 | Die Funktion von <i>Dlg5</i> im konditionale Knockout Modell der Maus | 55 |
| 4.1.1 | Die Deletion von <i>Dlg5</i> in den Darmepithelzellen der <i>Dlg5^{ΔIEC}</i> Mäuse führt zu keinen Unterschieden in der basalen Phänotypisierung im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen | 55 |
| 4.1.2 | Der konditionale Knockout von <i>Dlg5</i> führt zu einer höheren Empfindlichkeit der Mäuse im DSS-Entzündungsmodell | 57 |
| 4.1.2.1 | Triggerfaktoren können einen intestinalen Entzündungsprozess auslösen .. | 57 |
| 4.1.2.2 | Die <i>Dlg5^{ΔIEC}</i> Mäuse zeigen im klinischen Befund eine erhöhte Mortalitätsrate und eine stärkere Gewichtsabnahme | 58 |
| 4.1.2.3 | Die <i>Dlg5</i> Deletion in den murinen Darmepithelzellen führt zu einem signifikant höheren intestinalen Entzündungsgeschehen bei den <i>Dlg5^{ΔIEC}</i> Mäusen.... | 60 |
| 4.2 | Mögliche Bedeutung des Gens <i>DLG5</i> für die Integrität der Darmwandbarriere | 62 |
| 4.3 | Ausblick | 65 |
| 5 | Zusammenfassung | 67 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 69 |
| 7 | Anhang | 77 |
| 7.1 | Antikörper | 77 |
| 7.1.1 | Primäre Antikörper..... | 77 |
| 7.1.2 | Sekundäre Antikörper | 77 |
| 7.2 | Chemikalien, Enzyme, Medien und Zusätze | 78 |
| 7.3 | Puffer und Medien..... | 79 |
| 7.4 | Kits | 79 |
| 7.5 | Oligonukleotide | 80 |
| 7.6 | Taqmansonden | 79 |
| 8 | Danksagung | 81 |
| 9 | Lebenslauf | 82 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|---|
| A | Ampère |
| AGR | <i>anterior gradient protein</i> |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATG16L1 | <i>autophagy related 16-like 1</i> |
| BSA | <i>bovine serum albumin</i> |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| CARD | <i>caspase recruitment domain</i> |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| CED | Chronisch entzündliche Darmerkrankung |
| cre | <i>cyclization recombination</i> |
| CSF | <i>colony stimulating factor</i> |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DAI | <i>Disease Activity Index</i> |
| DLG | <i>disc large homolog</i> |
| Dlg1 | <i>drosophila disc large tumor suppressor</i> |
| DC | <i>detergent compatible</i> |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> (= Desoxyribonukleinsäure) |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| DSS | <i>dextran sodium sulfate</i> |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> |
| ELISA | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| ERK | <i>extracellular signal regulated kinase</i> |
| FERM | <i>4.1 ezrin radixin moesin</i> |
| FRMPD2 | <i>FERM und PDZ domain-containing protein 2</i> |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase |
| gt | <i>goat</i> (Ziege) |
| GPR | <i>G-protein coupled receptor</i> |
| GWAS | <i>genome wide association study</i> |
| HBSS | <i>Hank's balanced salt solution</i> |

| | |
|----------------------------------|---|
| HCL | Salzsäure |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> |
| hu | <i>human</i> |
| IEC | intestinale Epithelzellen |
| Ig | Immunglobulin |
| Il | Interleukin |
| IFN | Interferon |
| ITF | <i>intestinal trefoil factor</i> |
| IVC | <i>individually ventilated cage</i> |
| KCL | Kaliumchlorid |
| kDa | Kilo Dalton |
| KC | <i>keratinocyte chemoattractant, Il-8</i> |
| loxP | <i>locus of X-over P1</i> |
| M | Morbus bzw. Mol |
| MIP | Makrophagen-Inflammatorisches Protein |
| MMP | Magermilchpulver |
| MAGUK | Membran-assoziierten Guanylatkinase |
| MAPK | Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase |
| MDP | Muramyl-Dipeptid |
| MEK | MAP/ERK-Kinase |
| MEM | <i>minimal essential medium</i> |
| min | Minute |
| MMLV | <i>moloney-murine leukemia virus</i> |
| ms | <i>mouse</i> (Maus) |
| MUC | Mucin |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| NaCl | Natriumchlorid |
| Na ₂ HPO ₄ | Dinatriumhydrogenphosphat |
| NF-κB | <i>nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i> |
| NOD | <i>nucleotide oligomerization domain</i> |

| | |
|---------------|--|
| NSAID | <i>nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i> |
| PAMP | <i>pathogen associated molecular pattern</i> |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PDZ | <i>post synaptic density protein, drosophila disc large tumor suppressor, zonula occludens-1 protein</i> |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PSD95 | <i>post synaptic density protein</i> |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| qRT-PCR | <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> |
| Raf | Ras-aktivierbarer-Faktor |
| Ras | Ratten-Sarkom-Virus |
| rb | <i>rabbit</i> (Kaninchen) |
| rpm | <i>revolutions per minute</i> |
| RPMI | <i>roswell park memorial institute</i> |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> |
| rRNA | ribosomale RNA |
| rt | <i>Rat</i> (Ratte) |
| RT | Raumtemperatur |
| RTase | Reverse Transkriptase |
| s | Sekunde |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| sRT-PCR | <i>semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction</i> |
| siRNA | <i>small-interfering RNA</i> |
| SNP | <i>single nucleotide polymorphism</i> |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| TNBS | Trinitrobenzolsulfonsäure |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor- α |
| TTBS | Tween + Tris-buffered saline |
| TUNEL | <i>terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine-triphosphate (dUTP)-biotin nick end labeling</i> |
| v/v | <i>volume per volume</i> |

| | |
|------|-----------------------------------|
| w/v | <i>weight per volume</i> |
| Xbp1 | <i>x-box binding protein 1</i> |
| Zo-1 | <i>zonula occludens-1 protein</i> |

Nomenklatur von Genen und Proteinen

Mensch: *GEN* (z.B. *DLG5*), *PROTEIN* (z.B. *DLG5*)

Maus: *Gen* (z.B. *Dlg5*), *Protein* (z.B. *Dlg5*)

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Die Verpaarung von Mäusen, die das <i>loxP</i> -flanked <i>Dlg5</i> Allel tragen mit <i>Villin-cre</i> transgenen Mäusen führt zu einer spezifischen Deletion von <i>Dlg5</i> in den intestinalen Epithelzellen | 11 |
| Abbildung 2: Schemazeichnung zum murinen DSS-Colitis-Modell..... | 14 |
| Abbildung 3: Nachweis des geflochten Allels in der Genotypisierungs-PCR..... | 33 |
| Abbildung 4: Nachweis der <i>Dlg5</i> -Deletion in den Epithelzellen..... | 34 |
| Abbildung 5: Kein signifikanter Unterschied im Gewicht der <i>Dlg5^{AIEC}</i> und Wildtyp Mäuse nach 10 Wochen in der basalen Phänotypisierung | 35 |
| Abbildung 6: Kein signifikanter Unterschied in den Kolonlängen beider Mausgruppen in der basalen Phänotypisierung | 36 |
| Abbildung 7: HE-gefärbte Längsschnitte von Kolonpräparaten mit regulärem Wandaufbau | 37 |
| Abbildung 8: Deutlich erhöhte Mortalität in der Gruppe der <i>Dlg5^{AIEC}</i> Mäuse im DSS-Experiment | 38 |
| Abbildung 9: Stärkere Gewichtsabnahme während des DSS-Experiment in der Gruppe der <i>Dlg5^{AIEC}</i> Mäuse | 40 |
| Abbildung 10: Kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Colitis in den beiden Mausgruppen am 15. Tag des Experimentes | 41 |
| Abbildung 11: Bestimmung der Kolonlänge bzw. des Organgewichts der Wildtyp und <i>Dlg5^{AIEC}</i> Mäuse im DSS-Experiment..... | 43 |
| Abbildung 12: HE-gefärbte Kolonschnitte von einer Wildtyp (links) und <i>Dlg5^{AIEC}</i> Maus (rechts) | 44 |
| Abbildung 13: Signifikanter Unterschied bei der histologischen Auswertung der Kolonpräparate zwischen den Mausgruppen im DSS-Experiment | 45 |
| Abbildung 14: Signifikanter Unterschied bei der Beurteilung des Kolon- und Zoekumepithels zwischen den Mausgruppen im DSS-Experiment..... | 46 |
| Abbildung 15: Signifikant mehr TUNEL-positive Zellen bei den <i>Dlg5^{AIEC}</i> Mäusen..... | 47 |
| Abbildung 16: Keine Unterschiede in den mittels Multiplex analysierten Zytokinkonzentrationen bei den Wildtyp und <i>Dlg5^{AIEC}</i> Mäusen am Ende des DSS-Experiments | 50 |
| Abbildung 17: Kein Unterschied beim KC-ELISA zwischen den Wildtyp und <i>Dlg5^{AIEC}</i> Mäusen am Ende des DSS-Experiments | 51 |
| Abbildung 18: Keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression der Zytokine zwischen den Mausgruppen..... | 53 |
| Abbildung 19: Erhöhte Konzentration an phosphoryliertem ERK in mit siRNA gegen <i>DLG5</i> behandelten HeLa Zellen | 54 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Organisation aus den Versuchstieren | 12 |
| Tabelle 2: Disease Activity Index | 14 |
| Tabelle 3: Histologischer Score | 17 |
| Tabelle 4: Verwendete Formate und Volumina für siRNA-Transfektionen..... | 19 |
| Tabelle 5: PCR-Ansatz und PCR-Programm für Dlg5 | 22 |
| Tabelle 6: PCR-Ansatz und PCR-Programm für Villin-Cre..... | 22 |
| Tabelle 7: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese | 24 |
| Tabelle 8: sRT-PCR Ansatz und sRT-PCR-Programm | 25 |
| Tabelle 9: qRT-PCR Ansatz und qRT-PCR-Programm..... | 26 |
| Tabelle 10: Zusammensetzung des Trenngels | 28 |
| Tabelle 11: Zusammensetzung des Sammelgels | 28 |
| Tabelle 12: Verwendete primäre Antikörper mit Name des Herstellers | 77 |
| Tabelle 13: Verwendete sekundäre Antikörper mit Name des Herstellers..... | 77 |
| Tabelle 14: Bezeichnung und Name des Herstellers verwendeter Chemikalien und Zusätze . | 78 |
| Tabelle 15: Bezeichnung und Zusammensetzung verwendeter Puffer und Medien | 79 |
| Tabelle 16: Bezeichnung und Name des Herstellers verwendeter Kits | 80 |
| Tabelle 17: Bezeichnung, Sequenzen und Spezies der verwendeten Oligonukleotide | 80 |
| Tabelle 18: Bezeichnung, Spezies und Hersteller der verwendeten Taqmansonden | 79 |

1 Einleitung

1.1 Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

1.1.1 Definition und Ätiologie

Morbus Crohn (M. Crohn) und Colitis ulcerosa sind chronisch entzündliche Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, die durch klinische, histologische, endoskopische und radiologische Merkmale definiert sind (Podolsky 2002, Xavier und Podolsky 2007). Beide Krankheitsbilder sind Hauptvertreter der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Chronisch entzündliche Darmerkrankungen weisen Merkmale von polygenetischen Erkrankungen auf (Schreiber et al. 2005). Des Weiteren werden aber auch Umweltfaktoren, wie z.B. ein höherer Hygienestandard und veränderte Ernährungsgewohnheiten, für die Entstehung dieser Erkrankungen verantwortlich gemacht (Koutroubakis et al. 1996, Hampe et al. 2003, Schreiber et al. 2005).

1.1.2 Klinik

Das klinische Bild des M. Crohn ist durch einen segmentalen, diskontinuierlichen Befall von Dün- und Dickdarm charakterisiert (Böcker 2004). Die Entzündung umfasst alle Wandschichten des Darms (Renz-Polster 2004), die im histologischen Bild besonders von Makrophagen und T-Lymphozyten infiltriert sind und epitheloidzellige Granulome aufweisen (Xavier und Podolsky 2007). Bauchschmerzen, Durchfälle und extraintestinale Manifestationen, wie Arthritiden oder *Erythema nodosum*, sind charakteristische Symptome des M. Crohn (Herold 2009).

Im Gegensatz dazu besteht bei der Colitis ulcerosa ein retrograd vom Rektum ausgehendes kontinuierliches Ausbreitungsmuster. Dabei ist das proximale Ausmaß der Entzündung variabel und kann bis in das terminale Ileum reichen (Böcker 2004).

Die entzündlichen Infiltrate sind auf die Mukosa und Submukosa der Darmwand begrenzt und weisen eine hohe Anzahl an neutrophilen Granulozyten auf, die in der *Lamina propria* und in den Krypten Mikro-Abszesse bilden (Xavier und Podolsky 2007). Die Symptome bei der Colitis ulcerosa umfassen insbesondere schleimig-blutige Durchfälle, Tenesmen sowie seltener extraintestinale Manifestationen, wie primär sklerosierende Cholangitis (Herold 2009).

1.2 Pathophysiologie von CED: Barrierestörung

Charakteristisch für die Pathophysiologie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen ist ein gestörtes Zusammenspiel vieler verschiedener Komponenten.

Als eine der Ursache für die Entstehung von M. Crohn und Colitis ulcerosa wird ein Barrieredefekt in der Darmwand auf dem Boden einer genetischen Prädisposition angenommen (Schreiber et al. 2005). Der Darm als Grenzorgan zwischen Umwelt und dem Körperinneren besitzt eine Barrierefunktion, die durch mechanische Faktoren (z.B. Epithelzellen oder die Mukusschicht) und durch die Abwehrmechanismen des Organismus, welche das angeborene und erworbene Immunsystem beinhalten, aufrechterhalten werden (Hampe et al. 2001). Die Barriere soll verhindern, dass Makromoleküle und intakte Bakterien die Darmwand passieren und in das Innere des Organismus vordringen können (Xavier und Podolsky 2007).

1.2.1 Physiologie und Störungen der Barrierefunktion

1.2.1.1 Das Epithel und seine Zellen

1.2.1.1.1 Die Epithelzellen

Ein wichtiger Bestandteil der Darmwandbarriere ist die Epithelschicht der Mukosa, die mit ihren verschiedenen Zellen die Barrierefunktion aufrechterhält.

Epithelzellen fungieren dabei als physikalische Barriere und kontrollieren den transzellulären Transport. Daneben kommt ihnen aber auch eine bedeutende Funktion innerhalb des angeborenen Immunsystems zu (Jobin 2003, Gewirtz 2003). Sie besitzen *pathogen associated molecular pattern*-Rezeptoren (PAMP), mit denen sie eindringende und adhärente Pathogene erkennen und in der Folge unter anderem Chemokine und antimikrobielle Peptide induzieren können (O'Neil et al. 1999, Cario et al. 2000, Abreu et al. 2001, Hornef et al. 2002, Hisamatsu et al. 2003, Rosenstiel et al. 2003). Damit sind sie aktiv an der Immunantwort beteiligt (Schreiber et al. 2005).

Von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der oben genannten Funktionen und somit für eine Epithelzellintegrität ist eine Balance zwischen Epithelzellproliferation und –regeneration auf der einen und Apoptose veralteter oder geschädigter Zellen auf der anderen Seite. Eine Imbalance zwischen Apoptose und Proliferation führt zu einer Leckage in der epithelialen Barriere (Perse und Cerar 2012). Hierbei spielt u.a. auch der Mitogen-aktivierte-

Protein-Kinase (MAPK) Signalweg eine zentrale Rolle. Er stellt eine zentrale Schaltbahn der eukaryotischen Zelle dar, in die zahlreiche Signalwege einmünden, die elementare Funktionen wie Proliferation und Differenzierung steuern. Zu den einzelnen Komponenten dieser Kaskade gehören die Enzyme Ratten-Sarkom-Virus (Ras), Ras-aktivierbarer-Faktor (Raf), *extracellular signal regulated kinase* (ERK) sowie MAP/ERK-Kinase (MEK) (Müller-Esterl 2004). Mögliche Störungen in der Signalkaskade können zu einer erhöhten Apoptose und damit zu einem Funktionsverlust der Epithelzellen in der Aufrechterhaltung der Darmwandbarriere führen.

Neben den Epithelzellen spielen aber auch noch weitere Zellen im Darmepithel eine wichtige Rolle in der mukosalen Homöostase und damit in der Barrierefunktion der Darmwand.

1.2.1.1.2 Die Paneth-Zellen

Paneth-Zellen befinden sich an der Basis der Krypten des Dünndarms und sezernieren antimikrobielle Peptide, darunter auch das α -Defensin (Xavier und Podolsky 2007). M. Crohn Patienten mit einer *nucleotide-binding oligomerization domain containing 2* (*NOD2*) Mutation weisen eine geringere Expression von α -Defensinen auf, sodass vermutet wird, dass eine Reduktion der α -Defensine zu der Pathogenese von M. Crohn bei Patienten mit einer Mutation beiträgt (Wehkamp et al. 2004, Wehkamp et al. 2005).

1.2.1.1.3 Die Becherzellen

Becherzellen sind verantwortlich für die Produktion von *intestinal trefoil factor* (ITF), einem Protein, welches wichtig für die Abwehr und die epitheliale/mukosale Reparatur ist (Mashimo et al. 1996). Mäuse, die aufgrund eines Knockouts dieses Protein nicht produzieren, versterben im *dextran sodium sulfate* (DSS)-Colitis-Modell und zeigen eine geringe epitheliale Regeneration nach entzündungsbedingter Schleimhautschädigung (Mashimo et al. 1996). Muzine gehören zu den mechanischen Bestandteilen einer intakten Darmwandbarriere und werden ebenfalls von Becherzellen sezerniert. Das Muzin MUC2 wird in Patienten mit CED unterschiedlich exprimiert (Xavier und Podolsky 2007). Im Einklang damit zeigen *Muc2*^{-/-} Mäuse, die keine Becherzellen besitzen, das Bild einer spontanen Colitis (Van der Sluis et al. 2006, Sugimoto et al. 2008). Wichtig in diesem Zusammenhang ist auch die Rolle von *anterior gradient protein 2* (*AGR2*), das bereits 2006 von Zheng et al. als ein

Suszeptibilitätsgen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen identifiziert wurde (Zheng et al. 2006). AGR2 ist eine Proteindisulfidisomerase, die entscheidend für die Bildung von MUC2 ist (Park et al. 2009). *Agr2*^{-/-} Mäuse können keine intestinalen Muzine bilden, zeigen eine deutliche Reduktion an Becherzellen und haben eine stark erhöhte Anfälligkeit für experimentell induzierte Colitis (Park et al. 2009).

1.2.1.2 Adhäsionskomplexe

Neben den Zellen im Epithel spielen auch die Zell-Zell-Kontakte eine wichtige Rolle für die Integrität der Darmwandbarriere (Xavier und Podolsky 2007).

Dazu gehören die epithelialen Adhäsionskontakte (*adhesion junction*) und Verschlusskontakte (*tight junctions*), die beide von Zytokinen, Chemokinen und Immunzellen reguliert werden und eine physikalische Barriere der Darmwand darstellen (Xavier und Podolsky 2007). Sie dienen unter anderem der Zell-Zell-Erkennung zur Bildung und Erhaltung geordneter Zellverbände (*adhesion junction*) und dem Verschluss der interzellulären Spalten (*tight junctions*) (Lüllmann-Rauch 2003). Mithilfe einer Expressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass es in entzündetem Gewebe von Patienten mit CED zu einer deutlichen Herunterregulation der Adhäsionskontakte zwischen E-Cadherin und α -Catenin kommt (Gassler et al. 2001).

Ähnliche Befunde zeigen auch Kucharzik et al. Im Rahmen einer intestinalen Entzündung kommt es nämlich zu einer Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Mukosa der Darmwand (Kucharzik et al. 2005, Laukoetter et al. 2007, Sina et al. 2009). Kucharzik et al. beschreiben eine Assoziation zwischen dieser Transmigration und einer diffusen Herunterregulation von Occludin, einem Transmembranprotein der Verschlusskontakte, sowie weiteren Adhäsions- und Verschlussproteinen in entzündeten Darmabschnitten (Kucharzik et al. 2001).

Dieses führt zu einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität und somit zu einer Schwächung der intestinalen Barrierefunktion (Kucharzik et al. 2001).

1.2.2 Genomweite Assoziationsstudien

Wie eingangs bereits beschrieben, haben chronisch entzündliche Darmerkrankungen einen polygenetischen Hintergrund. Mit Hilfe von genomweiten Assoziationsstudien (*genome wide association study*, GWAS) konnten verschiedene Genloci identifiziert werden, die in Zusammenhang mit einer Suszeptibilität für chronisch entzündliche Darmerkrankung stehen.

Viele dieser bisher identifizierten Gene können aufgrund ihrer Funktion die Vermutung unterstützen, dass bei M. Crohn und Colitis ulcerosa z.B. eine Barrierestörung für die Pathogenese ursächlich ist.

1.2.2.1 NOD2

In verschiedenen Studien konnte *NOD2* in einen klaren Zusammenhang mit einer Prädisposition für chronisch entzündliche Darmerkrankungen gebracht werden und zwar unter anderem durch Defekte in der intrazellulären Erkennung von Pathogenen, die z.B. durch Varianten in dem Gen *NOD2* hervorgerufen werden (Hampe et al. 2001, Hugot et al. 2001, Ogura et al. 2001).

NOD2 ist ein intrazellulärer Rezeptor für die bakterielle Zellwandkomponente Muramyl-Dipeptid (MDP) und spielt eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Immunantwort auf zytoinvasive Pathogene (Girardin et al. 2003, Inohara et al. 2003). In Paneth-Zellen trägt es zur Expression von bakteriziden Peptiden, wie Defensinen und Cryptidinen (murine intestinale alpha-Defensine) bei, die möglicherweise als Pfortner für die intestinale Flora fungieren (Kobayashi et al. 2005). Durch proinflammatorische Zytokine kommt es in intestinalen Epithelzellen zu einer Hochregulation von *NOD2*, das hier als ein direkter antibakterieller Faktor wirkt (Hisamatsu et al. 2003). Überexpression von *NOD2* führt zur Freisetzung des chemotaktischen Zytokins Interleukin-8, das der stärkste bekannte Aktivator von neutrophilen Granulozyten ist (Rosenstiel et al. 2003, Schreiber et al. 2005). Eine beeinträchtigte Funktion von *NOD2*, wie es bei M. Crohn der Fall ist, führt daher zu einem komplexen Defekt, der einen erleichterten Eintritt von Bakterien in die Darmwand, abgeschwächte bakterizide Kapazität und reduzierte epitheliale Immunabwehr beinhalten würde (Wehkamp et al. 2004).

Alternativ wird für die Pathophysiologie der Erkrankung im Zusammenhang mit einer *NOD2*-Mutation eine Zunahme der *nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells* (NF- κ B) Aktivität und eine vermehrte Sekretion des Zytokins Interleukin-1 β , die nach Transfektion eines verkürzten *NOD2* Proteins bemerkt worden war, verantwortlich gemacht (Maeda et al. 2005). Wie der genaue Mechanismus hierfür ist, bleibt aber noch unklar (Schreiber et al. 2005).

Lipinski et al. konnten *FERM and PDZ domain-containing 2* (FRMPD2) als einen Mediator bzw. Gerüstprotein des *NOD2* Signalweges identifizieren (Lipinski et al. 2012). FRMPD2 enthält PDZ Domänen, die entsprechende Proteine zu der basolateralen Membran einer Zelle

leiten und den Aufbau von großen Signalkomplexen erleichtern (Nourry et al. 2003, Stenzel et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass FRMPD2 die NOD2-vermittelte MDP-Erkennung zur basolateralen Membran von intestinalen Epithelzellen leitet. Dieses wiederum ist essentiell für die Aktivierung von NF- κ B. Eine genetische Verkürzung von der NOD2 Leucin-reichen Domäne, welche mit M. Crohn assoziiert ist, beeinträchtigt die Interaktion mit FRMPD2. Gleichzeitig führt eine intestinale Entzündung zu einer Herunterregulation von FRMPD2. Diese Ergebnisse suggerieren einen strukturellen Mechanismus, wie die Epithelzellpolarität auf die intestinalen NOD-ähnlichen Rezeptor-Signalwege in der Erkennung von Bakterien und der Kontrolle der Immunantwort in Abhängigkeit der räumlichen Spezifität wirkt (Lipinski et al. 2012).

1.2.2.2 ATG16L1

Ebenfalls von Bedeutung für die Barrierefunktion der Darmwand ist ein gestört ablaufender intrazellulärer Prozess der Autophagie. Die Autophagie dient dem Abbau von Organellen und der Elimination von zellulären und bakteriellen Substanzen (Lee et al. 2012).

Hampe et al. konnten im Rahmen einer *single nucleotide polymorphism* (SNP)-Studie mit Proben von Patienten mit M. Crohn eine Variante im *autophagy related 16-like 1* (ATG16L1) Gen identifizieren (Hampe et al. 2007). ATG16L1 ist Teil des Autophagosomen-Prozesses, welcher unter anderem in der Prozessierung intrazellulärer Bakterien beteiligt ist und somit das Konzept des M. Crohn als entzündliche Barriestörung unterstützen würde (Hampe et al. 2007).

Sowohl bei gleichzeitig vorliegender *caspase recruitment domain* (CARD15)/NOD2 Mutation als auch ohne weitere Mutationen, stellt sich die ATG16L1 Variante rs2241880 als ein Risikofaktor für M. Crohn dar (Hampe et al. 2007).

In diesem Zusammenhang konnte ein konditionales Knockout-Maus-Modell von Adolph et al. weitere Erklärung für die Bedeutung von ATG16L1 in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erbringen (Adolph et al. 2013). Die Paneth-Zellen dieser *Atg16l1^{AIEC}* Mäusen wiesen eine geringere Größe sowie eine geringere Anzahl von meist diffusen Granula auf, was wiederum die antimikrobielle Funktion dieser Zellen schwächte. Verstärkt wurde der Effekt durch die Verpaarung mit *x-box binding protein 1* (*Xbp1*) Knockout Mäusen, *Xbp1^{AIEC}* Mäusen, bei denen ein erhöhter endoplasmatisches Retikulum (ER) Stress vorliegt, der wiederum im Epithel vieler Patienten mit CED nachweisbar ist. Die

so generierten *Atg16l1/Xbp1^{ΔIEC}* Mäuse zeigten das Bild einer schweren spontanen Colitis mit einer diskontinuierlichen submukosalen oder transmuralen Entzündung.

Diese Ergebnisse zeigen die wichtige Funktion der Autophagie und im Besonderen von ATG16L1 für die Aufrechterhaltung der Darmhomöostase (Adolph et al. 2013).

Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass in den intestinalen Epithelzellen der *Atg16l1^{ΔIEC}* Mäuse eine im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen höhere Konzentration von *inositol requiring enzyme 1α* (IRE1α) vorliegt, welches die NF-κB Aktivität reguliert, sodass ebenfalls eine erhöhte Konzentration von NF-κB nachgewiesen werden kann, das wiederum eine wichtige Rolle in der intestinalen Entzündung spielt (Rogler et al. 1998, Adolph et al. 2013).

Somit unterdrückt ATG16L1 die IRE1α Aktivität und eine Zunahme der Autophagie verbessert die ER Stress-induzierte intestinale Entzündung und verringert die NF-κB Überaktivität und den Zelltod des intestinalen Epithels (Adolph et al. 2013).

1.2.2.3 Interleukin-23R

Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-23 hat eine wichtige Rolle für die Entstehung und die Aufrechterhaltung von organ-spezifischen autoimmunen Entzündungskrankheiten (Langrish et al. 2005). Es wird von aktivierten dendritischen Zellen und Makrophagen als Antwort auf mikrobielle Stimulation produziert (Langrish et al. 2004, Morrison et al. 2011).

In einer genomweiten Assoziationsstudie konnten Duerr et al. eine Assoziation zwischen M. Crohn und einem SNP im *interleukin-23 receptor (Il-23R)* Gen identifizieren, das für eine Untereinheit des Interleukin-23-Rezeptors kodiert (Duerr et al. 2006).

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Il-23 eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankung spielt. Verantwortlich hierfür sind unter anderem gewebsständige T-Gedächtniszellen, die durch Il-23 aktiviert werden und ihrerseits die proinflammatorischen Zytokine Il-17 und Il-6 produzieren (Yen et al. 2006).

Ein weiterer Effekt von Il-23 scheint die Aktivierung/Aufrechterhaltung der *cluster of differentiation* (CD) 4⁺ T-Helfer (Th) 17 Zellen zu sein, die ihrerseits Zytokine, wie Il-17A, Il-17F, Il-22 und Il-21 produzieren (Aggarwal et al. 2003, Langrish et al. 2005, Weaver et al. 2007, McGeachy und Cua 2008, Morrison et al. 2011).

Diese Zytokine haben zum Teil eine gewebsprotektive Funktion, indem sie die intestinale Barrierefunktion unterstützen (Il-17A und Il-22), tragen aber durch eine proinflammatorische Wirkung auch zur Pathogenese der Erkrankung bei (Il-17F und Il-21) (Kinugasa et al. 2000,

Chen et al. 2003, Ogawa et al. 2004, Fina et al. 2008, Sugimoto et al. 2008, Yang et al. 2008, Zenewicz et al. 2008, Morrison et al. 2011).

Eine weitere mögliche Ursache für den pathogenen Effekt von Il-23 könnte dessen indirekte Wirkung auf die Produktion von Interferon- γ sein. Hierbei wandeln sich unter dem Einfluss von Il-23 Th17-Zellen in so genannte *Th-1-like* „ex-Th17“ Zellen um und produzieren statt Il-17 das proinflammatorische Zytokin Interferon- γ . Diese „ex-Th17“ Zellen wirken somit an der Pathogenese der Erkrankung mit, indem sie proinflammatorische Mediatoren produzieren (Khader et al. 2005, Kullberg et al. 2006, Lee et al. 2009, Hirota et al. 2011, Morrison et al. 2011).

1.2.3 DLG5

Neben den oben genannten im Zusammenhang mit M. Crohn identifizierten Genen, deren Funktion in großen Teilen bereits verstanden wird, gibt es viele Gene, die eine Assoziation mit CED besitzen, über deren Funktion aktuell nur wenig bekannt ist. Zu diesen Genen gehört *disc large homolog 5 (DLG5)*, welches erstmals 2004 als krankheitsrelevantes Gen für M. Crohn beschrieben werden konnte (Stoll et al. 2004).

DLG5, ein evolutionär konserviertes Gen (Nechiporuk et al. 2007), gehört zu der Gruppe der Membran-assoziierten Guanylatkinasen (MAGUK) und hat eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung der epithelialen Zellintegrität (Nakamura et al. 1998, Stoll et al. 2004). *DLG5* kann sowohl in Kolon- und Dünndarmgewebe als auch in isolierten primären Darmepithelzellen nachgewiesen werden (Stoll et al. 2004) und verfügt auch im Hirn- und Nierengewebe über eine wichtige Funktion bei der Epithelzellintegrität (Nechiporuk et al. 2007). Dieses konnten Nechiporuk et al. in einem Tiermodell mit *Dlg5*^{-/-} Mäusen zeigen. Der Verlust von Zellpolarität und die aufgrund einer fehlenden Ependymzellschicht dysplastisch wachsenden Zellen im Ventrikelsystem des sich entwickelnden Gehirns führt hier zu einem Verschluss des Aquädukts und schließlich zu einem Hydrozephalus. Des Weiteren bilden sich Nierenzysten, die sich aufgrund eines Polaritätsverlusts besonders des Sammelrohrepithels und des damit verbundenen Zilienverlusts entwickeln (Nechiporuk et al. 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *DLG5*, als Suszeptibilitäts-gen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen, mit seiner Funktion, u.a. im Bereich der Zell-Zell-Kontakte und damit in der Aufrechterhaltung der Zellintegrität, die Theorie der Barrierestörung unterstützt.

1.3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Einordnung der Funktion von *DLG5* in die molekularen Mechanismen bei intestinaler Entzündung, wie sie bei CED vorliegt. Hierzu soll mithilfe eines spezifischen Maus Knockout Modells, bei dem eine Deletion von *DLG5* nur in den intestinalen Epithelzellen vorliegt, die Rolle von *DLG5* im Rahmen der intestinalen Immunantwort auf eine Darmentzündung untersucht werden. Ferner sollen durch *in vitro* Zellkultur-Experimente Einblicke in die molekulare Funktion von *DLG5* möglich werden.

Mit diesen Untersuchungen soll versucht werden Erkenntnisse zu gewinnen, die zum besseren Verständnis der Pathophysiologie von CED beitragen.

2 Material und Methoden

Eine tabellarische Auflistung aller verwendeten Chemikalien, Antikörper, Enzyme, Kits und Primer, sowie die Zusammensetzung der Pufferlösungen und Medien befinden sich im Anhang.

2.1 Tiere

2.1.1 Generierung der *Dlg5^{AI/EC}* Mäuse

Für die Experimente wurden *Dlg5^{AI/EC}* Mäuse verwendet, die durch einen konditionalen Knockout eine Deletion des *Dlg5*-Gens in den intestinalen Epithelzellen besitzen (Generierung der Mäuse im Rahmen einer Industriekooperation mit der Firma AstraZeneca, Schweden).

Das Prinzip der epithelzellspezifischen Deletion beruht auf dem *Cre-lox P*-Verfahren. Dabei kann eine *Cre*-Rekombinase (*cyclization recombination*), codiert durch das *Cre*-Gen, DNA-Abschnitte rekombinieren (z.B. bestimmte Gene deletieren, hier: *Dlg5*) wenn eine entsprechende Erkennungssequenz im DNA Molekül vorhanden ist. Diese Erkennungssequenz bezeichnet man als *locus of X-over P1* (lox P), die vor und hinter dem DNA-Abschnitt lokalisiert ist (*floxed*), der das zu deletierende Gen bzw. mindestens ein Exon dieses Gens enthält (hier: Exon 3 und 4). Im Fall der epithelzellspezifischen Deletion wurde eine Villin-Promotorsequenz im 5' Bereich des *Cre*-Rekombinase Gens gentechnisch eingefügt. Da nur intestinale Epithelzellen das transkriptionell aktive Protein Villin exprimieren, wird die *Cre*-Rekombinase auch nur hier aktiviert und es kommt zu einer Zielgendeletion (hier: Exon 3 und 4 des *Dlg5* Gens) (Adachi et al. 2006).

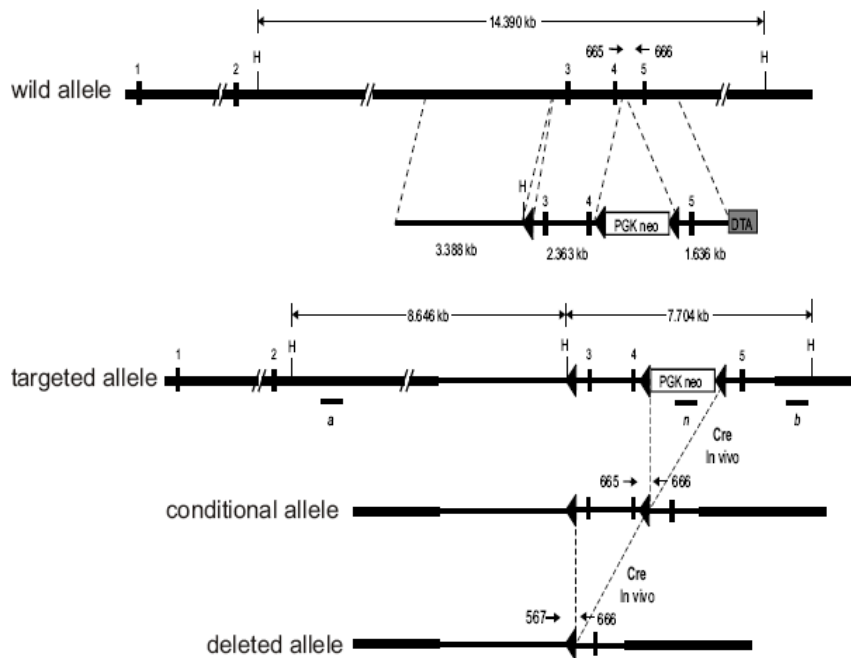


Abbildung 1: Die Verpaarung von Mäusen, die das loxP-flanked *Dlg5* Allel tragen mit Villin-cre transgenen Mäusen führt zu einer spezifischen Deletion von *Dlg5* in den intestinalen Epithelzellen

Abgebildet ist die native 5' Region des *Dlg5* Gens sowie der Zielvektor, darunter das Ziel Allel, das konditionale Allel und schließlich das deletierte Allel, wobei hierbei Exon 3 und 4 entfernt wurden. Die vertikalen Striche markieren die Exons.

Die Abbildung wurde von AstraZeneca freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Tierhaltung

Die Haltung der *Dlg5^{AIEC}* und Wildtyp Mäuse erfolgte unter Spezifisch-Pathogen-Freien (SPF) Bedingungen in individuell ventilierten Käfigen (*individually ventilated cage*, IVC) oder Filterdeckel-Macrolon-Käfigen der Firma „Ehret“ bei freiem Zugang zu Wasser und Futter. Es herrschte ein Tag/Nacht-Rhythmus von 12 / 12 Stunden bei einer Raumtemperatur von 20 – 25 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 – 80 %. Käfige mitsamt Einstreu und Futter wurden vor dem Einsetzen der Mäuse autoklaviert (20 min, 121 °C), ebenso das Trinkwasser. Es wurde Futter der Firma SSNIFF (MZ15, autoklavierbar) und deionisiertes Wasser verwendet.

2.1.3 Organisolierung aus den Versuchstieren

Am Ende des Experiments wurden die Tiere mit Ketamin/Xylazin betäubt und Vollblut durch Punktion des Herzens entnommen. Das Blut wurde in EDTA oder Heparin Monovetten

überführt, für 5 min. bei 10.000 rpm zentrifugiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert. Im Anschluss wurden die Tiere getötet.

Nach Eröffnen der Bauchhöhle wurden die Leber und die Milz entnommen, gewogen und die Gewebestücke in Eppendorf-Gefäße stickstoffgefroren und bei –80 °C gelagert. Nun wurde der gesamte Darm freigelegt und Kolonkot, das Kolon und das terminale Ileum sowie die mesenterialen Lymphknoten entnommen. Das Zoekum wurde gewogen und die Kolonlänge bestimmt (Ende Zoekum bis Rektum). Nun wurden das Kolon und das terminale Ileum entnommen und die Lymphknoten für Protein- bzw. Ribonukleinsäure-Isolation (*ribonucleic acid*, RNA) bei –80 °C eingefroren. Darmgewebe und Lymphknoten für die histopathologischen Untersuchungen wurden ebenso wie Milz und Leber in 4%iges PFA gegeben, welches nach 7 Tagen auf 1% verdünnt wurde.

Tabelle 1: Organisation aus den Versuchstieren

| Organ | Größe/Menge | Abschnitt | Verwendungszweck |
|----------|-------------------------|---|---|
| Kolon | linke Hälfte je 1 cm | proximal-distal proximal 2 x mittig distal | - Genexpression oder Proteinlysate - Histopathologie |
| Zoekum | 0,5 cm | komplett | - Genexpression oder Proteinlysate - Histopathologie |
| Ileum | 0,5 cm | ileozoekaler Übergang | - Genexpression oder Proteinlysate - Histopathologie |
| Jejunum | 3 cm | komplett | - Genexpression oder Proteinlysate - Histopathologie |
| Duodenum | 0,5 cm | proximal | - Genexpression oder Proteinlysate - Histopathologie |
| Leber | 2 Teile | komplett | - Genexpression oder Proteinlysate - Histopathologie |
| Milz | 2 Teile | komplett | - Genexpression oder Proteinlysate - Histopathologie |
| MLN | 2 Teile | komplett | - Genexpression oder Proteinlysate - Histopathologie |
| Serum | 500 µl | Herz | - ELISA/Multiplex |

2.1.4 Basale Phänotypisierung

Für die Phänotypisierung wurde der Gewichtsverlauf und die Dickdarmlänge unbehandelter Mäuse bestimmt und histologische Schnitte von Ileum und Kolon angefertigt.

2.1.4.1 Gewichtsbestimmung

Zur Beurteilung des Gewichtsverlaufs im Rahmen der basalen Phänotypisierung wurde bei den *Dlg5^{ΔIEC}* und Wildtyp Mäusen über einen Zeitraum von 10 Wochen das Gewicht in g regelmäßig bestimmt.

2.1.4.2 Kolonlänge

Für den Vergleich der Darmlängen wurde den *Dlg5^{ΔIEC}* und Wildtyp Mäusen jeweils der komplette Darm entnommen und anschließend die Länge des Kolons in cm bestimmt. Genauere Angaben zur Organisolation der Versuchstiere siehe unter 2.1.6.

2.1.4.3 Histologische Schnitte

Siehe unter 2.1.7.1

2.1.5 Induktion einer chronischen Colitis durch Gabe von DSS

Zur Induktion einer chronischen Colitis erfolgte die Gabe von 1,5%igem *dextran sodium sulfate* (DSS, Molekularmasse 40 kDa) im Trinkwasser der Mäuse.

Hierbei wurde den *Dlg5^{ΔIEC}* und Wildtyp Mäusen über einen Zeitraum von zunächst 5 Tagen Trinkwasser gegeben, das mit 1,5%igem DSS versetzt war. Im Anschluss folgten 5 Tage, an denen die Mäuse normales Trinkwasser erhielten. Nach diesen 5 Tagen wiederholte sich die Gabe von Trinkwasser mit 1,5%igem DSS für 6 Tage, gefolgt von 4 Tagen, an denen die Mäuse wieder normales Trinkwasser erhielten.

Für die Experimente wurden nur männliche Tiere verwendet, deren Alter mind. 8 und höchstens 32 Wochen betrug.

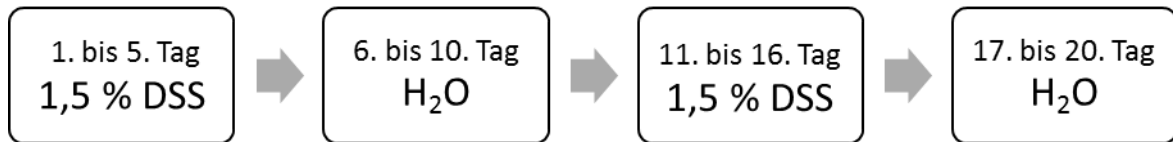


Abbildung 2: Schemazeichnung zum murinen DSS-Colitis-Modell

2.1.6 Disease Activity Index

Der so genannte *Disease Activity Index* (DAI) beurteilt den Schweregrad der Erkrankung und umfasst den Körpergewichtsverlust, die Stuhlkonsistenz, sowie den okkulten oder sichtbaren perianalen Blutabgang mittels Haemocult-Test (Beckman Coulter, Krefeld-Fischeln, Germany) (Siegmond et al. 2001a). Die entsprechenden Befunde erhielten jeweils eine Punktzahl, je nach Schwere des Befundes (max. 4 pro Befund), und wurden anschließend zum DAI-Score addiert. Die angegebenen Parameter wurden alle zwei Tage protokolliert, um den DAI-Score zu errechnen. Die maximal zu erreichende Summe von Punkten lag bei 12, was einem sehr schweren Krankheitsverlauf entspricht, der niedrigste Wert lag bei 0 und zeigt die Abwesenheit jeglicher Krankheitssymptome an. Einzelne Punktwerte und Parameter: siehe Tabelle.

Tabelle 2: Disease Activity Index

| Gewichtsverlust | Stuhlkonsistenz | Perianale Blutungen | Punkte |
|-----------------|--|---------------------|--------|
| 0 % | gut-geformter Stuhl | negativer Haemocult | 0 |
| 1-5 % | - | - | 1 |
| 6-10 % | schmieriger & halb-geformter Stuhl, der nicht am Anus haftet | positiver Haemocult | 2 |
| 11-20 % | - | - | 3 |
| >20 % | flüssiger Stuhl, der am Anus haftet | sichtbare Blutung | 4 |

2.1.7 Histopathologische Analyse

2.1.7.1 Hämatoxylin-Eosin Färbungen

Die Organe wurden wie in Abschnitt 2.1.6 beschrieben entnommen und in 4% bzw. 1% Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Danach wurden die Organpräparate in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom (Leica, Wetzlar) in 4 µm dicke Scheiben geschnitten. Auf dem Objektträger wurden die Schnitte luftgetrocknet und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (Xylolersatz 2 x 10 min; 100% Ethanol 2 x 5 min; 90% Ethanol 5 min; 80% Ethanol 3 min; 70% Ethanol 3 min; 50% Ethanol 3 min; Aqua bidest 5 min) entparaffiniert.

Die Objektträger mit den Schnitten wurden 5 min in Hämatoxylin und Eosin 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 2 x 5 min; Xylolersatz 3 min) und das Eindeckeln mit einem xylolfreien Eindeckmedium und Deckglas.

2.1.7.2 TUNEL-Färbungen

Die *terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine-triphosphate (dUTP)-biotin nick end labeling* (TUNEL)-Färbung dient der Kennzeichnung apoptotischer Zellen. Hierfür wurde das *ApoTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* an Paraffinschnitten verwendet. Freie Hydroxygruppen, die im Rahmen der Apoptose entstandenen fragmentierten DNA-Stränge, werden durch das Enzym TdT mit digoxigenin-konjugierten Nukleotiden markiert. Anschließend werden diese digoxigenin-Nukleotide durch einen anti-digoxigenin Antikörper gebunden, der an ein Peroxidase-Reportermolekül konjugiert ist. Nach Zugabe des Substrates entsteht so ein Chromogen, das lichtmikroskopisch detektiert werden kann.

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung in einer absteigenden Alkoholreihe (Xylolersatz 1 x 10 min; 100% Ethanol 3 x 30 s; 96% Ethanol 30 s; 70% Ethanol 30 s; PBS-Spülung 5 min), danach wurden die Schnitte mit Proteinase K bei Raumtemperatur (RT) für 15 min inkubiert und anschließend für 2 mal 2 min mit Aqua bidest gespült.

Für 5 min wurde nun die endogene Peroxidase bei RT mit 3%-igem H₂O₂ blockiert, die Schnitte erneut für 2 mal 5 min mit PBS gespült und im Anschluss direkt mit dem Equilibrierungspuffer (75µl/5cm²) für mindestens 10 s bei RT inkubiert.

Als nächster Schritt wurde das TdT-Enzym (55µl/5cm²) aufgetragen und für 1 Stunde in der feuchten Kammer bei 37°C belassen.

Die Schnitte wurden nun für 10 min unter leichter Bewegung und danach für 10 min bei RT in eine Küvette mit Stop/Waschpuffer gestellt, danach für 3 mal 1 min in PBS gewaschen und anschließend für 30 min mit der erwärmten Anti-Digoxigenin Peroxidase in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen für 4 mal 2 min in PBS, wurde die Peroxidase aufgetragen und für 3 bis 6 min belassen. Um die optimale Reaktionszeit festzustellen, kann man die Farbentwicklung unter dem Mikroskop betrachten.

Im Anschluss wurden die Schnitte zunächst für 3 mal 1 min in Aqua bidest gewaschen und danach noch einmal für 5 min in Aqua bidest bei RT inkubiert.

Abschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun, wofür die Präparate für 1 min in eine Küvette mit Hämalaun gestellt und danach für 8 min unter fließendem Leitungswasser gebläut wurden.

Nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol 5 s; Xylolersatz 3 x 2 min) wurden die Schnitte mit einem xylolfreien Eindeckmedium (Roth) und Deckglas eingedeckelt.

2.1.7.3 Histologischer Score

Mithilfe eines histologischen Scores wurde auf mikroskopischer Ebene das entzündlich veränderte Kolongewebe beurteilt. Hierfür wurde ein modifizierter Score nach Siegmund et al. bzw. Laroui et al verwendet (Siegmund et al. 2001a, Laroui et al. 2012). Der Score beinhaltet sowohl die Beurteilung von Entzündungszellinfiltraten, Kryptenschädigungen als auch Ulzerationen.

Dabei erhalten gelegentlich auftretende Entzündungszellinfiltrate in der *Lamina propria* 0 Punkte, eine erhöhte Anzahl von Entzündungszellinfiltraten in der *Lamina propria* 1 Punkt, eine Ausbreitung der Entzündungszellen in die Submukosa 2 Punkte und eine transmurale Ausbreitung des Infiltrats 3 Punkte.

Das Vorliegen von intakten Krypten wurde mit 0 Punkten, der Verlust des basalen Drittels der Krypten mit 1 Punkt, der Verlust der basalen Zweidrittel mit 2 Punkten, ein kompletter

Kryptenverlust mit 3 Punkten, eine Veränderung der Oberfläche mit vereinzelt Erosionen mit 4 Punkten und konfluierende Erosionen mit 5 Punkten bewertet.

Des Weiteren wurde das Vorkommen von Ulzerationen beurteilt: das Fehlen von Ulzerationen wurde mit 0 Punkten, ein oder zwei Ulzerationen mit 1 Punkt, drei oder vier Ulzerationen mit 2 Punkten und konfluierende Ulzerationen mit 3 Punkten beurteilt.

Die maximale Punktzahl lag bei 11 Punkten und entspricht einem stark entzündeten Gewebe mit ausgeprägter Darmwandschädigung.

Tabelle 3: Histologischer Score

| Entzündungszellinfiltrate | Kryptenschädigung | Ulzerationen | Punkte |
|--|--|----------------------------|----------|
| Vereinzelte Zellen in der <i>Lamina propria</i> | Intakte Krypten | Keine Ulzerationen | 0 |
| Erhöhte Anzahl von Zellen in der <i>Lamina propria</i> | Verlust des basalen Drittels der Krypte | 1 oder 2 Ulzerationen | 1 |
| Infiltrate reichen bis in die Submukosa | Verlust der basalen Zweidrittel der Krypte | 3 oder 4 Ulzerationen | 2 |
| Ausgedehnte Infiltrate transmural | Kompletter Kryptenverlust | Konfluierende Ulzerationen | 3 |
| | Veränderung der Oberfläche mit Erosionen | | 4 |
| | Konfluierende Erosionen | | 5 |

2.1.7.4 Epithelverlust

Zusätzlich zum histologischen Score erfolgte die isolierte Beurteilung des Darmepithels der Mäuse. Hierbei wurden Punkte in Abhängigkeit der prozentualen Schädigung des Epithels verteilt, dabei entsprechen 0 Punkte einem intakten Epithel und 10 Punkte einem kompletten Epithelverlust (=100%).

2.2 Zellbiologische Methoden

Während aller Arbeiten mit Zellkulturen wurde auf sterile Bedingungen geachtet und ausschließlich sterile Materialien, Puffer und Medien verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden an einer Sicherheitswerkbank (HeraSafe, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) durchgeführt.

2.2.1 Zelllinie

Die in dieser Arbeit verwendete humane Krebszelllinie HeLa (DMSZ Nr.: ACC57; Zelltyp: *human cervix carcinoma*; Kulturmedium: RPMI + 10% FKS) wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen und in Nährmedium bei 37 °C und 5 % (v/v) Kohlendioxid (CO₂) kultiviert.

Die Konfluenz und Morphologie der Zellkultur wurde zweimal pro Woche mittels eines Inversmikroskops (h500, Hund, Wetzlar) visuell überprüft. Bei 80 %-iger Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden die adhärenen Zellen mit erwärmtem PBS gewaschen und für 5 min bei 37 °C mit Trypsin/EDTA-Lösung behandelt. Um das Ablösen der Zellen zu stoppen erfolgte die Zugabe von FKS-haltigem Medium. Die Zellsuspensionen wurden nun in 50 ml-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1.700 U/min in einer Zentrifuge (Varifuge 3.0R, Heraeus, Kendro Laboratory Products Sorvall® und Heraeus® Laborgeräte, Langenselbold) pelletiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 5 ml Medium resuspendiert und in 25 ml-Kulturflaschen überführt oder direkt in definierter Zelldichte für das entsprechende Experiment ausgesät. Die Zellen wurden maximal bis zur 25. Passage verwendet und einmal pro Monat auf Kontamination mit Mykoplasmen untersucht.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden Trypan-Blau und eine Neubauer-Zählkammer (VWR International, Darmstadt) verwendet. Trypan-Blau ist ein Azofarbstoff, der selektiv tote Zellen anfärbt und zur Bestimmung der Zell-Vitalität eingesetzt wird.

Für die Auszählung wurde 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypan-Blau-Lösung (0,4 %) vermischt und 10 µl dieser Verdünnung in die Zählkammer eingebracht. Anschließend wurden die Zellen unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl der ausgezählten Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadranten}} \times 10.000$$

2.2.3 Zellkultur und Transfektion von eukaryotischen Zellen mit siRNA

Mit der Transfektion von sogenannter *small-interfering* RNA (siRNA) können gezielte Gene in der Zelle ausgeschaltet werden. siRNA sind kurze RNA-Moleküle von 21-23

Basenpaaren Länge, die sich mit einer komplementären *messenger*-RNA (mRNA) verbinden. Dadurch steht dieser mRNA Abschnitt nicht mehr zur Translation zur Verfügung, wodurch das entsprechende Ziel-Gen ausgeschaltet wird (Elbashir et al. 2001a, Elbashir et al. 2001b).

Für die transiente Transfektion von siRNA in eukaryotische Zellen wurde das Polyamin-basierte Reagenz siPORT™ Amine (Ambion, Austin, USA) verwendet.

Zunächst erfolgte die Kultivierung der für die Transfektion vorgesehenen HeLa Zellen. Hierfür wurde das Zellpellet zunächst in 12 ml Medium (MEM *with Earle's Salts* + 10% FKS + 1% Penicillin/Streptomycin) aufgenommen und dann auf eine Platte mit 6 Vertiefungen (*tissue culture plate*, Sarstedt, Newton, USA) ausgesät, je 2 ml pro Vertiefung. Über Nacht wurden die Zellen dann bei 37°C im Inkubator kultiviert.

Am Folgetag erfolgte dann die Transfektion. Hierfür wurden jeweils 2 Aliquot von FKS-freiem Zellkulturmedium verwendet, wobei das eine mit siPORT™ Amine und das andere mit siRNA vermischt wurde und jeweils für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurden die beiden Ansätze gemischt und nach zehnmütiger Inkubation zu den Zellen hinzu pipettiert. Je nach Plattengröße wurden für die Ansätze unterschiedliche Volumina verwendet (s. Tabelle 4).

Anschließend wurden die Zellen dem Experiment entsprechend stimuliert und im Anschluss geerntet. Dafür wurde die Zellkulturplatte auf Eis überführt, mit eiskaltem PBS gewaschen und die Zellen anschließend mit einem Gummischaber vom Boden der Platte abgelöst. Die in PBS gelösten Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 1300 rpm für 5 min bei Raumtemperatur sedimentiert. Danach wurden die Zellpellets entweder sofort zur Proteinbestimmung lysiert oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Tabelle 4: Verwendete Formate und Volumina für siRNA-Transfektionen

| Plattenformat | Plattengesamt-volumen [ml] | siRNA [μ mol] pro Medienvolumen | siPORT™ Amine [μ l] pro Medienvolumen |
|-------------------------|----------------------------|--------------------------------------|--|
| 6- <i>well</i> -Platte | 2 | 7,5/100 μ l | 5/100 μ l |
| 12- <i>well</i> -Platte | 1 | 3/50 μ l | 3/50 μ l |
| 24- <i>well</i> -Platte | 0,5 | 1,5/25 μ l | 1,5/25 μ l |
| 96- <i>well</i> -Platte | 0,1 | 0,3/10 μ l | 0,3/10 μ l |

2.2.4 Isolierung primärer muriner Darmepithelzellen

Für die Isolierung der intestinalen Epithelzellen wurde das *Lamina Propria Dissociation Kit* (Miltenyi Biotec) verwendet. Mithilfe dieses Kits können einzelnen Zellsuspensionen aus der *Lamina propria* von Darmgewebe herausgelöst werden, indem die extrazellulären Adhäsionsproteine, die für die Aufrechterhaltung der Gewebestruktur notwendig sind, mechanisch und enzymatisch herausgelöst werden.

Zunächst wurde der Darm herauspräpariert (s. 2.1.3 Organisolierung) und mit *Hanks's balanced salt solution* (HBSS) gewaschen um Fäzes zu entfernen. Als nächstes wurde der Darm longitudinal aufgeschnitten und anschließend quer in ca. 0,5 cm große Stücke geteilt. Nun erfolgte die Inkubation der Darmstücke in eine *predigestion* Lösung für 20 min bei 37°C unter kontinuierlicher Rotation, anschließend wurden sie dann für 10 s gevortext. Als nächstes wurden die Proben auf einen *MACS SmartStrainer* überführt und anschließend erneut in eine *predigestion* Lösung für 20 min bei 37°C unter kontinuierlicher Rotation inkubiert, gevortext und auf einen *MACS SmartStrainer* überführt.

Nach erneuter Inkubation für 20 min diesmal in HBSS und Vortexen für 10 s erfolgte zum dritten Mal das Auftragen auf den *MACS SmartStrainer*. Diese Fraktion enthielt die intestinalen Epithelzellen (IEC) sowie die intraepithelialen Lymphozyten und wurde in dieser Arbeit als IEC-Fraktion bezeichnet. Im nächsten Schritt wurde eine Enzymlösung in einem *gentleMACS C Tube* hergestellt, bestehend aus 100 µl Enzym D, 50 µl Enzym R und 12,5 µl Enzym A, welche mit einer vorgeheizten *digestion* Lösung gemischt wurde. Nach Überführen der verbliebenen Gewebestücke (ohne IEC) in das *gentleMACS C Tube* erfolgte die Inkubation für 30 min bei 37°C unter kontinuierlicher Rotation. Anschließend wurde das *gentleMACS C Tube* umgekehrt auf den *gentleMACS Dissociator* befestigt und das Programm *m_intestine_01* gestartet. Nach Beendigung des Programms wurde das *Tube* entfernt und die Zellen bei 300 x g zentrifugiert. Diese Fraktion beinhaltet u.a. Immunzellen der *Lamina propria* sowie andere Zelltypen des verbliebenen Gewebes, wie z.B. Muskelzellen aus der Muskularis und wird im Folgenden als LP-Fraktion bezeichnet. Die beiden Fraktionen wurden pelletiert und je nach anschließendem Experiment erfolgte die Aussaat und Kultivierung der Zellen bzw. die Herstellung von Proteinlysaten.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem UV-Photometer (NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer, ©PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei 260 nm bestimmt. Um Proteinverunreinigungen (Absorption bei 280 nm) auszuschließen wurden der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt und nur Proben mit einem Verhältnis zwischen 1,6 und 2,0 verwendet.

2.3.2 Isolierung von genomischer DNA aus Mäuseschwänzen

Die DNA-Isolierung erfolgt mithilfe des Dneasy Tissue-Kits (Qiagen, Hilden).

Zur Bestimmung des Genotyps der Tiere wurden ca. 2 mm Schwanzspitze von den Mäusen verwendet und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Nun wurde 180 µl ATL-Puffer mit 20 µl Proteinase K in die Eppendorf-Gefäße pipettiert, die Proben gevortext und anschließend bei 56°C für ca. 2 h inkubiert. Dabei wurden die Schwänze wiederholt gevortext, um sie zu zersetzen. Nach Zugabe von 200 µl AL-Puffer gemischt mit 200 µl Ethanol wurde noch einmal gründlich gevortext und der Mix nun auf die Säulen pipettiert. Nach einminütiger Zentrifugation bei 8.000 rpm wurde der Durchfluss verworfen, die Säule in ein neues Tube gesetzt und 500 µl AW1 Puffer auf die Säule pipettiert. Nach einminütiger Zentrifugation bei 8.000 rpm wurde der Durchfluss erneut verworfen, die Säule wieder in ein neues Tube gesetzt und diesmal 500 µl AW2 Puffer auf die Säule pipettiert und 3 min bei 13.200 rpm zentrifugiert. Nach Überführen der Säule in ein steriles 1,5 Eppendorf-Gefäß wurde 100 µl AE Puffer pro Eppendorf-Gefäß hinzugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Nun wurde noch einmal bei 8.000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Eluat mit der enthaltenen DNA gewonnen.

2.3.3 Genotypisierungs-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode um einen genau definierten Abschnitt DNA oder komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) mithilfe einer DNA-Polymerase zu vervielfältigen (amplifizieren) (Mullis und Faloona 1987). Die aus dem Schwanzgewebe der Maus gewonnene genomische DNA wurde für die Genotypisierung eingesetzt. Spezifische Primer und die DNA-Polymerase GoTaq™ (Promega,

Madison, USA) wurden in einem Gradienten *Thermocycler* (Biometra, Göttingen) verwendet, um spezifisch DNA-Bereiche zu amplifizieren, die die Bestimmung des Genotyps erlauben. Die verwendeten Oligonukleotidprimer mit den jeweiligen Hybridisierungstemperaturen sind im Anhang aufgelistet.

Tabelle 5: PCR-Ansatz und PCR-Programm für Dlg5

| PCR-Komponente | Volumen [µl] | Temperatur [°C] | Zeit [min] | Zyklusanzahl |
|--|--------------|------------------------|------------|--------------|
| DNA | 3,0 | 94 | 4:00 | 1 |
| 5x <i>GoTaqTM</i> Reaktionspuffer | 4,0 | 94 | 0:30 | 35 |
| Primer-Mix (jeweils 0,5 µl) | 1,0 | T _{anneal} 63 | 0:30 | |
| dNTP-Mix (jeweils 10 mM) | 0,5 | 72 | 1:00 | |
| <i>GoTaqTM</i> DNA-Polymerase | 0,2 | 72 | 8:00 | 1 |
| Aqua bidest ad. 20 µl | 11,3 | 10 | ∞ | 1 |

Tabelle 6: PCR-Ansatz und PCR-Programm für Villin-Cre

| PCR-Komponente | Volumen [µl] | Temperatur [°C] | Zeit [min] | Zyklusanzahl |
|--|--------------|------------------------|------------|--------------|
| DNA | 3,0 | 94 | 3:00 | 1 |
| 5x <i>GoTaqTM</i> Reaktionspuffer | 4,0 | 94 | 0:30 | 30 |
| Primer-Mix (jeweils 0,5 µl) | 1,0 | T _{anneal} 62 | 0:30 | |
| dNTP-Mix (jeweils 10 mM) | 0,5 | 72 | 1:30 | |
| <i>GoTaqTM</i> DNA-Polymerase | 0,2 | 72 | 1:00 | 1 |
| Aqua bidest ad. 20 µl | 11,3 | 10 | ∞ | 1 |

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit der Software *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>, National Institutes of Health, USA) quantifiziert und ausgewertet.

2.3.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus intestinalen Epithelzellen

Die RNA-Isolierung aus den intestinalen Epithelzellen wurde mithilfe des Rneasy-Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, in 350 µl RLT Puffer (supplementiert mit 10 µl/ml 2-Mercaptoethanol) lysiert und durch Zentrifugation über eine QiaShredder[®]-Säule bei 13.000 rpm für 2 min bei RT aufgeschlossen. Der

Durchfluss wurde mit gleichem Volumen 70 %igem Ethanol versetzt und auf eine Rneasy-Säule aufgebracht. Die RNA wurde nun durch Zentrifugation (30 s bei 10.000 rpm) an die Membran gebunden und der Durchfluss verworfen. Die an die Säule gebundene RNA wurde nach einem Waschschrift mit 350 µl Puffer RW1 (30 s bei 10.000 rpm) durch zwei 30-minütige Inkubationen mit Dnase-Lösung (10 µl Dnase I in 70 µl RDD Puffer) von verbliebener genomischer DNA gereinigt. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 350 µl RW1 und Zentrifugation bei 10.000 rpm für 30 s. Anschließend wurden jeweils zwei mal 500 µl RPE auf die Säulen pipettiert und zentrifugiert. Hiernach wurden die Säulen auf ein unbenutztes Auffangröhrchen überführt und zum Trocknen nochmals für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die Säulen wurden nun erneut auf ein neues, steriles, Rnase-freies Gefäß gegeben, mit 30–50 µl Rnase-freiem Wasser versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Elution der Gesamt-RNA erfolgte durch einen letzten Zentrifugationsschritt (1 min, 12.000 rpm) in ein frisches Rnase-freies Röhrchen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Während bei intakten RNA-Proben lediglich die 18S- und 28S-rRNA-Banden zu erkennen sind, deuten zusätzliche Banden oder ein Verschmieren der rRNA-Banden auf Kontamination oder Degradation der RNA hin. Um Kontaminationen der RNA-Proben mit genomischer DNA auszuschließen, wurde eine Test-PCR mit isolierter RNA als Matrize durchgeführt. Nur RNA-Proben, die keine GAPDH-Bande beruhend auf der Amplifikation genomischer DNA zeigten, wurden für die reverse Transkription verwendet.

2.3.5 cDNA-Synthese

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase ist die Synthese von cDNA aus einem RNA-Template möglich. Hierfür wurden eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (=Reverse Transkriptase) aus dem Retrovirus *moloney-murine leukemia virus (MMLV)* verwendet. Für die Bindung an RNA benötigt diese RNA-abhängige DNA-Polymerase einen Primer, der mithilfe eines Oligo-dT-Abschnittes (10-15 Thyminbasen), der komplementär zum Poly-A-Schwanz der mRNA ist, an die mRNA bindet. Für die die Herstellung der cDNA wurde das Advantage[®] RT-for-PCR Kit (Clontech, Heidelberg) verwendet, welches neben einer retroviralen *MMLV* Transkriptase alle weiteren benötigten Komponenten enthält. Die Zusammensetzung und der Ablauf einer cDNA-Synthese sind in der Tabelle dargestellt.

Im ersten Schritt wurden 500 ng Gesamt-RNA mit 1 µl oligo(dT)-Primer in einem mit RNase-freiem Wasser aufgefüllten Gesamtvolumen von 13,5 µl für 2 min bei 70°C vorinkubiert, damit der Primer an die mRNA-Moleküle binden kann. Nun wurden 6,5 µl eines Mastermixes hinzugefügt, der den 5X RT-Puffer, dNTPs, synthetischen RNase-Inhibitor und das Enzym *MMLV*-Reverse Transkriptase enthielt, und für ein Stunde bei 42°C inkubiert. Danach wurde das Enzym durch Erhitzen für 5 min auf 98°C inaktiviert und schließlich die cDNA mit 80 µl DEPC-behandeltem Wasser (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt) 1:5 verdünnt und bis zur weiteren Nutzung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 7: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

| Komponente | Volumen/Menge | Inkubation |
|---|---------------|---------------------------------------|
| Gesamt-RNA | 500 ng | 2 min bei 70 °C |
| Oligo(dT) ₁₈ -Primer | 1,0 µl | |
| Aqua bidest (RNase-frei) | Ad 13,5 µl | |
| 5-fach Reaktionspuffer | 4,0 µl | 1 h bei 42 °C + 5 min bei 95 °C |
| dNTP-Mix (jeweils 10 mM) | 1,0 µl | |
| Rekombinanter RNase-Inhibitor (40 U/µl) | 0,5 µl | |
| <i>MMLV</i> -Reverse-Transkriptase (200 U/µl) | 1,0 µl | |
| Gesamtvolumen | 20,0 µl | |

2.3.6 Semiquantitative *reverse transcriptase* PCR (sRT-PCR)

Um die fehlende Expression des *Dlg5* Gens in den intestinalen Epithelzellen von *Dlg5^{ΔIEC}* Mäusen auf mRNA-Ebene zu zeigen, wurden entsprechende genspezifische Primer synthetisiert und in Anlehnung an die Methode nach Mullis zur Amplifikation von DNA-Fragmenten benutzt. Dabei wurde ebenfalls die DNA-Polymerase GoTaq™ (Promeega, Madison, USA) verwendet (s.2.2.3). Basierend auf der Sequenzinformation der jeweiligen mRNA wurden die Primerpaare so gewählt, dass die Länge des resultierenden Amplikons zwischen 200 und 1000 bp betrug.

Tabelle 8: sRT-PCR Ansatz und sRT-PCR-Programm

| PCR-Komponente | Volumen [µl] | Temperatur [°C] | Zeit [min] | Zyklenanzahl |
|--|--------------|---------------------|------------|--------------|
| cDNA | 3,0 | 94 | 4:00 | 1 |
| 5x <i>GoTaqTM</i> Reaktionspuffer | 4,0 | 94 | 0:30 | 35 |
| Primer-Mix (jeweils 0,5 µl) | 1,0 | T _{anneal} | 0:30 | |
| dNTP-Mix (jeweils 10 mM) | 0,5 | 72 | 1:00 | |
| <i>GoTaqTM</i> DNA-Polymerase | 0,2 | 72 | 8:00 | 1 |
| Aqua bidest ad 20 µl | 11,3 | 10 | ∞ | 1 |

In einigen Fällen wurden im Anschluss die gewonnenen PCR-Produkte ebenfalls mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit der Software *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>, National Institutes of Health, USA) densitometrisch quantifiziert. Die Expression entsprechender Zielgene wurde als Mittelwert von mindestens zwei unabhängigen Experimenten in Relation zur β -Actin Expression berechnet.

2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde verwendet, um z.B. bei der Genotypisierung oder dem Deletionsnachweis von *Dlg5*, lineare DNA-Fragmente ab einer Größe von 200 bp zu trennen und zu identifizieren. Die DNA-Fragmente werden dabei in Abhängigkeit von der Agarosekonzentration im Gel [0,5 bis 2,0 % (w/v)] entsprechend ihrer Größe und Gestalt aufgetrennt. Nachdem die DNA-Proben hierfür mit zehnfachem Auftragspuffer versetzt worden sind, wurden sie zusammen mit einem Marker in die Taschen des Gels aufgetragen und bei konstanter Spannung von 90 Volt 20-60 min aufgetrennt. Durch das Hinzufügen von 2 µl *SYBR® Safe DNA Gel Stain*, das mit der DNA interkaliert, kann die Größe der DNA Fragmente durch die Exposition an UV Licht mithilfe der UV-Geldokumentationsanlage (Molecular Imager ChemiDoc XRS Imaging System, Bio-Rad) visualisiert werden.

2.3.8 Quantitative *real-time* PCR (Taqman-PCR)

Die quantitative *real-time* PCR (qPCR) nach dem Taqman-Prinzip ermöglicht die Quantifizierung von mRNA unter Verwendung Zielgen-spezifischer Oligonukleotide. Die

qPCR basiert auf der Methode der klassischen PCR mit einem zusätzlichen DNA Quantifizierungsschritt am Ende eines jeden Amplifikationszyklus.

Für die Experimente wurde das *Taqman® Gene Expression Assay* der Firma Applied Biosystems verwendet, das bereits die entsprechenden Primer enthält (Auflistung der Sonden im Anhang). In der Tabelle ist der Reaktionsansatz mit dem entsprechenden Programm aufgeführt.

Tabelle 9: qRT-PCR Ansatz und qRT-PCR-Programm

| PCR-Komponente | Volumen [µl] | Temperatur [°C] | Zeit [min] | Zyklusanzahl |
|-------------------------------------|--------------|-----------------|------------|--------------|
| cDNA | 5,0 | 50 | 2:00 | 1 |
| <i>Gene Expression Taqman Assay</i> | 0,5 | 95 | 10 | 1 |
| <i>Gene Expression Mastermix</i> | 4,5 | 95 | 0:15 | 45 |
| Gesamtvolumen | 10 | 60 | 1:00 | |

Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf eine 384-Platte mithilfe des *7900 DNA Fast Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems) aufgetragen.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Gesamtproteinlysaten aus Zellen

Für die Proteinanalysen unter anderem zum Nachweis von Dlg5 in den intestinalen Epithelzellen der Mäuse wurde das Gesamtprotein isoliert. Die Zellen bzw. die Zellpellets wurden je nach Größe in 70 bis 100 µl gekühltem Lysepuffer 1x DLB + 1% Phosphatase-Inhibitor Cocktail II + 2% 50x Protease-Inhibitor-Cocktail resuspendiert. Anschließend wurden die Lysate für 5 min bei 99°C im Heizblock (Blockthermostat, BT 100, Kleinfeld Labortechnik, Gehrden) aufgekocht und nach Ultraschallbehandlung für 2 x 5 sec (Bandelin Sonopuls HD 200, Bandelin *electronic*, Berlin) mit zwischenzeitlicher Kühlung erneut zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen (16.000 g, 15 min, 4°C, Sigma 3K30, Braun Biotech). Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis belassen oder zur längeren Lagerung bei -20°C gelagert.

2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford unter der Verwendung des *detergent compatible* (DC) Protein Assays (Biorad, München). Durch die Reaktion des Farbstoffes Coomassie-Blau mit basischen Aminosäuren verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm hin zu 595 nm. Für die Messung wurden 5 µl Proteinlysate 1:2 in H₂O verdünnt und die entsprechenden Assay Reagenzien hinzugefügt. Durch die Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge kann die Konzentration einer unbekannt Proteinelösung mithilfe der aus dem BSA-Standard bestimmten Eichgeraden, kalkuliert werden.

2.4.3 Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch die denaturierende Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-Page) in Anlehnung an die Methode nach Laemmli (Laemmli 1970). Durch die Zugabe des anionischen Detergenzes SDS und durch Erhitzen der Proben werden die Eigenladungen der Proteine überdeckt und die Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgelöst. So werden schließlich die denaturierten Proteine durch ihr konstantes Ladung/Masse-Verhältnis im Polyacrylamidnetz nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Zu Beginn wurde das Gel, entsprechend des erwarteten Molekulargewichtes des zu detektierenden Proteins, aus den unten genannten Komponenten hergestellt. Die Proben wurden je nach Proteingehalt zum Auftragen mit H₂O verdünnt und mit 5x SDS Ladepuffer versetzt und dann für 5 min bei 99°C erhitzt. Es wurden 12 µg/Tasche aufgetragen und zusammen mit 8µl eines Proteingrößenmarkers (BioRad) elektrophoretisch aufgetrennt (Gelkammer: Multigel G44, Biometra). Nach einem Sammellauf von 30 min bei 15 mA/Gel wurden die Proteine je nach Molekulargewicht bei 35 mA/Gel für 45 min bis 120 min aufgetrennt.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Trenngels

| Komponente | Größe des Zielproteins [kDa] | | | |
|---------------------------|------------------------------|---------|---------|--------|
| | 10-60 | 20-100 | 30-120 | 50-200 |
| Acrylamid | 15 % | 12 % | 10 % | 7,5 % |
| N,N'-Methylenbisacrylamid | 5 ml | 4,15 ml | 3,5 ml | 2,5 ml |
| 4x Trenngelpuffer | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml |
| Aqua bidest | 2,5 ml | 3,5 ml | 4,15 ml | 5 ml |
| TEMED | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl |
| 10 % (v/w) APS | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |

Tabelle 11: Zusammensetzung des Sammelgels

| Komponente | Sammelgel (3 % Acrylamid) |
|---------------------------|---------------------------|
| N,N'-Methylenbisacrylamid | 0,3 ml |
| 4x Sammelgelpuffer | 0,75 ml |
| Aqua bidest | 1,95 ml |
| TEMED | 3 µl |
| 10 % (v/w) APS | 30 µl |

2.4.4 Immobilisierung von Proteinen durch Elektrotransfer (Westernblot)

Die Methode nach Towbin beruht darauf, dass die aufgetrennten Proteine aus der Polyacrylamidmatrix über das senkrecht zum Gel angelegte elektrische Feld eluiert und auf die Membran transferiert und immobilisiert werden.

Die Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) wurde 10 s in Methanol aktiviert, anschließend mind. 5 min in Aqua bidest äquilibriert und danach 5 min in Anodenpuffer 1 belassen. 3 Whatman-Filterpapiere wurden exakt zugeschnitten und je eins in Anodenpuffer 1, Anodenpuffer 2 und Kathodenpuffer gelegt. Nach Beenden des Gellaufs, wurde das Gel aus der Kammer entfernt, von polymerisierten Gelresten gereinigt und von dem Kathoden-Filterpapier bedeckt. Der Blot wurde umgedreht und die PVDF-Membran luftblasenfrei auf die andere Gelseite aufgebracht, gefolgt von Anodenpuffer-1-Papier und Anodenpuffer-2-Papier. Der Blot wurde nun in die Blottingapparatur (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad, München) gelegt und je nach Größe und Anzahl der Gele ein Strom von 0,8 mA/cm² für 55 min angelegt.

2.4.5 Immundetektion von Proteinen

Die Immundetektion erfolgt durch spezifische Primärantikörper und *horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper, die gegen die Ursprungsspezies des Primärantikörpers gerichtet sind. Das Prinzip beruht auf der chemilumineszenten Reaktion, bei der Licht abgegeben wird, das mittels geeigneter Röntgenfilme sichtbar gemacht und dokumentiert werden kann.

Nach Abschluss des Proteintransfers wurde die PVDF-Membran in 5 %igem Magermilchpulver (MMP) in TTBS bei RT für 1 h inkubiert um die unspezifischen Bindungsstellen abzublocken. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurde die Membran zunächst 3 x 5 min in TTBS gewaschen und anschließend für 30 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 5 %igem MMP in TTBS mit einem Verdünnungsfaktor von 1:500 bis 1:1000. Nach dreimaligem Waschen in TTBS für jeweils 30 min, wurde der Blot mit ECL-Reagenz-Mix (ECL™ PLUS, Amersham Biosciences, Freiburg) überschichtet und 2 min bei RT inkubiert. Das überschüssige Reagenz wurde entfernt und schließlich der Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia) für 1 min – 10 min belichtet und maschinell entwickelt (Curix 60, GFA, Leverkusen).

Um weitere Proteine auf derselben Membran zu untersuchen, können die gebundenen Antikörpern durch „Strippen“ von der Membran entfernt und diese bis zu dreimal zur wiederholten Immundetektion benutzt werden. Das Strippen erfolgte durch Inkubation der PVDF-Membran für 30 min bei 56°C in Stripping-Puffer, gefolgt von mehrmaligem Waschen in TTBS und Wiederholung des Inkubationsprozesses mit Antikörpern. Um eine vergleichbare Beladung der aufgetragenen Proteinmenge zu überprüfen, wurden hier beispielsweise Antikörper verwendet, die entweder gegen die unphosphorylierte Form des Zielproteins oder gegen ein gut charakterisiertes *housekeeping*-Gen (β -Actin, GAPDH) gerichtet waren.

2.4.6 Zytokinbestimmungen

2.4.6.1 *Keratinocyte chemoattractant* ELISA

Der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) wurde zum Nachweis von *keratinocyte chemoattractant* (KC) unter Verwendung des CytoSet von BioSource Europe (Nivelles, Belgien) durchgeführt. Das Prinzip des Assays beruht auf der Immobilisierung von KC durch

einen spezifischen, an eine Oberfläche gekoppelten Antikörper (sog. *capture* Antikörper) und der anschließenden immunologischen und kolorimetrischen Detektion. Für diesen Schritt wird ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper (sog. *detection* Antikörper) verwendet, der die Umsetzung einer Farbstoffvorstufe in einen Farbstoff katalysiert. Da die Absorptionsintensität proportional zur Konzentration an Peroxidase ist, und diese wiederum die Menge an immobilisiertem Antigen widerspiegelt, kann über eine Eichkurve die Konzentration von KC bestimmt werden.

Die verwendeten Puffer und Antikörper waren in dem Kit enthalten und wurden mit Aqua bidest bzw. PBS im angegebenen Verhältnis verdünnt.

Zur Vorbereitung wurde zunächst eine Platte mit 96 Vertiefungen über Nacht mit je 100 µl *Coating solution* pro Vertiefung inkubiert, anschließend mit PBS-Tween gewaschen und dann mit je 300 µl *assay buffer* pro Vertiefung für 1 h bei RT geblockt. Nach Entfernung des *Assay Buffer* wurde als nächstes je 100 µl des vorbereiteten Standards und je 100 µl Serum pro Vertiefung aufgetragen. Direkt im Anschluss wurde je 50 µl *detection antibody* hinzupipettiert und dann für 2 h bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS-Tween wurde die Streptavidin-Peroxidase hinzugegeben, für 30 min inkubiert und dann erneut 5 x mit PBS-Tween gewaschen. Nun wurde TMB Substrat zu den Proben pipettiert, die Farb-Reaktion mit *stop solution* beenden und schließlich die Absorption des Farbstoffs bei 450 nm mit Hilfe des GeniosPro-Plattenreaders (Tecan Trading AG, Schweiz) bestimmt.

2.4.6.2 Multiplex ELISA

Multiplex-ELISA ermöglichen den Nachweis und die Quantifizierung von verschiedenen Analyten (Proteinen, Peptiden) in einer einzelnen Probe.

Der Nachweis verschiedener Zytokine, u.a. Interleukin-1 β (Il-1 β), Interleukin-6 (Il-6), *keratinocyte Chemoattractant* (KC), Interleukin-10 (Il-10), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ) und Makrophagen-Inflammatorisches Protein-1 α (MIP-1 α), wurde mit dem *Bio-Plex ProTM Mouse Cytokine 23-plex Assay* der Firma Biorad (München) durchgeführt. Mit diesem Kit können insgesamt 23 Zytokine nachgewiesen werden; die entsprechenden Puffer, Lösungen und Antikörper sind in dem Kit enthalten. Die Messungen der Immunoassays wurden durch die Firma Bioglobe in Hamburg durchgeführt.

2.5 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mithilfe von GraphPad Prism (Version 6.0) für Windows Software (GraphPad Software, San Diego, CA) durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem T-Test bewertet. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Züchtung der konditionalen Knockout Maus *Dlg5^{ΔIEC}*

Um die Funktion von DLG5 zu untersuchen, wurde ein konditionales Knockout Maus-Modell verwendet.

Hierbei wurde das Gen *Dlg5* nur in den intestinalen Epithelzellen deletiert, um zu untersuchen, welche Auswirkungen dieser selektive Knockout für die Mäuse hat und zwar einmal unter physiologischen und im Weiteren unter pathophysiologischen Bedingungen nach Induktion einer Colitis. Ein konstitutiver Knockout, d.h. eine Deletion von *Dlg5* im gesamten Körpergewebe (*Dlg5^{-/-}*), führte, wie Nechiporuk et al. in ihrer Studie zeigen konnten, zu schweren Fehlbildungen wie Hydrozephalus und Nierenzysten (Nechiporuk et al. 2007).

Aus diesem Grund und zur genaueren Untersuchung der zelltypspezifischen Funktion von *Dlg5* im Epithel, wurde das oben beschriebene konditionale Knockout-Modell verwendet.

Mithilfe dieses epithelzell-spezifischen Knockout Modells sollte die Rolle von *Dlg5* im Rahmen der intestinalen Entzündung und Immunantwort sowohl klinisch als auch auf molekularer Ebene untersucht werden.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde nach o.g. Prinzip eine gewebespezifische Deletion von *Dlg5* erzeugt und zwar durch das Verpaaren epithelzellspezifisch *Cre*-Rekombinase exprimierender Mausstämme (B6.SJL-Tg(Vil-cre)^{997Gum/J}, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) mit Mäusen (AstraZeneca) in denen das *Dlg5* Gen von zwei lox P Sequenz-Motiven flankiert ist (siehe 2.1.1).

Um den Genotyp der konditionalen Mäuse zu detektieren, erfolgte eine Genotypisierung mittels PCR. Hierfür wurde genomische DNA aus den Schwänzen der Mäuse isoliert. Mittels spezifischer Primer (665, forward: 5'-GGCTGAATCCTGATTATGAGA-3'; 666, reverse: 5'-TGAGTCCAAGAGGCACAAGT-3' und 667, forward: 5'-AGACATTTATATGCTTCCGGTCTTGG-3') und nachfolgender PCR konnte anhand der Bandenmuster im Agarosegel das geflochte Allel nachgewiesen werden. Dabei wies das geflochte Allel eine Größe von 0,424 kb auf, während das Wildtyp Allel 0,282 kb groß ist.

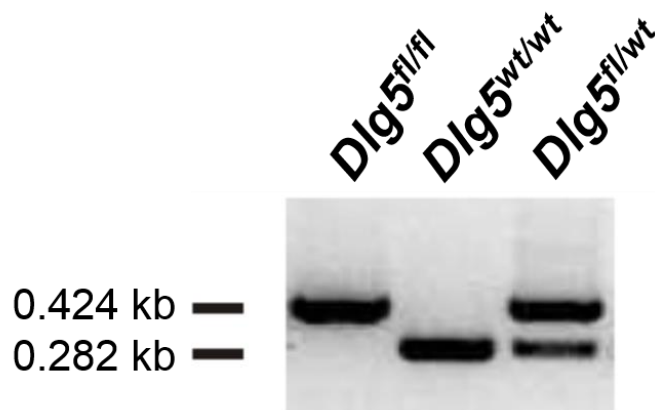


Abbildung 3: Nachweis des geflochten Allels in der Genotypisierungs-PCR

Abgebildet ist eine Genotypisierungs-PCR. Die Probe der Maus, die das geflochte Allel trägt ($Dlg5^{fl/fl}$), weist eine Bande auf Höhe von 0.424 kb auf. Eine Bande auf Höhe von 0.282 kb weist auf eine Probe einer Maus ohne geflochtenes Allel hin ($Dlg5^{wt/wt}$). Eine Doppelbande auf Höhe von 0.424 kb und 0.282 kb zeigt eine Heterozygotie für das *floxed* Allel ($Dlg5^{fl/wt}$).

Im nächsten Schritt wurde dann der Nachweis des Vorhandenseins von *Villin-Cre* ebenfalls mittels entsprechender PCR nachgewiesen. Eine Besonderheit der Nachweismethode hierbei ist, dass nur eine Bande sichtbar ist (Cre^+ oder Cre^-), sodass nicht bestimmt werden kann, ob ein $Cre^{+/-}$ oder ein $Cre^{+/+}$ vorliegt.

Anhand dieser beiden Genotypisierungs-PCRs konnten die Mäuse detektiert werden, die sowohl ein geflochtenes Allel trugen als auch *Villin-Cre* positiv waren ($Dlg5^{fl/fl}Cre^+$ in dieser Arbeit als $Dlg5^{AIEC}$ bezeichnet). Als Kontrolle wurden die Geschwistertiere verwendet, die entweder das geflochte Allel trugen, aber für *Villin-Cre* negativ waren ($Dlg5^{fl/fl}Cre^-$) oder für *Villin-Cre* positiv waren, aber nicht das geflochte Allel trugen ($Dlg5^{wt/wt}Cre^+$) (in dieser Arbeit wurden beide Kontroll-Genotypen als Wildtyp bezeichnet).

3.1.1 Nachweis der gewebespezifischen Deletion von *Dlg5* in den $Dlg5^{AIEC}$ Mäusen

Zunächst erfolgte der Nachweis der *Dlg5* Deletion durch die fehlende Genexpression von *Dlg5* in den intestinalen Epithelzellen der Mäuse. Hierfür wurde RNA aus den Epithelzellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese schließlich mittels RT-PCR amplifiziert und im Agarose-Gel nachgewiesen. Bei der Auswertung konnte gezeigt werden, dass das Transkript

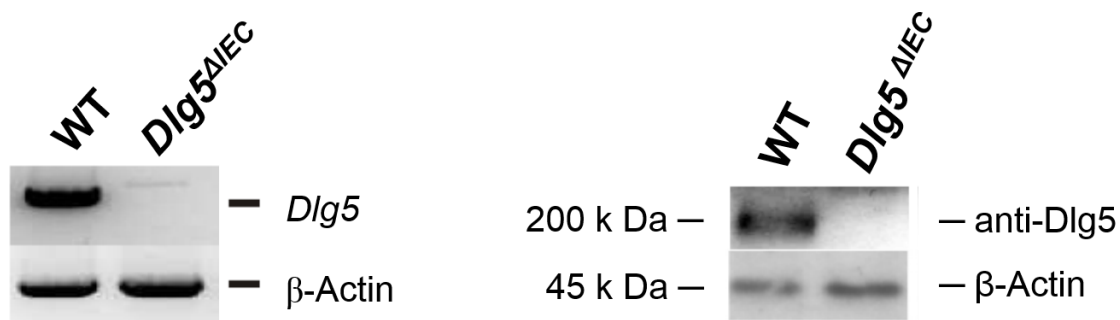
bei den *Dlg5^{ΔIEC}* Mäusen im Kolongewebe nicht vorhanden war, wohingegen es bei den Wildtyp Mäusen nachweisbar war.

Um relevante Unterschiede in der Ausgangsmenge der verwendeten mRNA auszuschließen, wurde parallel zum Zielgen die Expression des *housekeeping*-Gens *β-Actin* untersucht.

Um den Erfolg der gewebespezifischen Deletion von *Dlg5* auch auf Proteinebene zu belegen, erfolgte eine Untersuchung des Kolongewebes mithilfe des Westernblots.

Für den Westernblot wurden Kolonepithelzellen von *Dlg5^{ΔIEC}* Mäusen und Wildtyp Mäusen gewonnen und auf die Proteinexpression des 200 kDa großen Proteins Dlg5 hin analysiert.

Dabei zeigte sich in Höhe von 200 kDa bei den Wildtyp Mäusen eine Bande, die bei den Knockout Mäusen fehlte. Zur versuchsinternen Kontrolle wurden die Proben außerdem auf die Expression des *housekeeping*-Proteins *β-Actin* untersucht. Hierbei zeigte sich auf Höhe von 42 kDa, der entsprechenden Größe von *β-Actin*, in beiden Gewebeproben eine Bande. Dieser Befund beweist, dass weder das Fehlen von Proteinen noch eine Fehldetektion zu einem falsch negativen Ergebnis geführt haben und es sich bei den *Dlg5^{ΔIEC}* Mäusen folgerichtig um einen gewebespezifischen Knockout von Dlg5 handelt.



A **B**
Abbildung 4: Nachweis der *Dlg5*-Deletion in den Epithelzellen

Abbildung **A** zeigt eine RT-PCR mit Nachweis der gewebespezifischen *Dlg5*-Deletion durch Detektion der fehlenden Genexpression, Abbildung **B** zeigt die Deletion auf Proteinebene mittels Westernblot. Zu sehen ist jeweils die fehlende Bande bei den *Dlg5^{ΔIEC}* Mäusen. *β-Actin*, als versuchsinterne Kontrolle, ist mit beiden Methoden nachweisbar.

3.2 Basale Phänotypisierung

Zunächst wurde der basale intestinale Phänotyp der *Dlg5^{ΔIEC}* und Wildtyp Mäuse untersucht.

3.2.1 Gewichtsbestimmung

Der Gewichtsverlauf der Mäuse wurde zu verschiedenen Zeitpunkten als Parameter für Entwicklungsstörungen der Mäuse über einen Zeitraum von 10 Wochen dokumentiert. Das Durchschnittsgewicht der *Dlg5^{ΔIEC}* Mäuse lag im Alter von 10 Wochen bei $22,4 \pm 2,63$ g.

Bei den Wildtyp Mäusen lag das Körpergewicht nach 10 Wochen durchschnittlich bei $22,5 \pm 2,72$ g. Somit bestand kein relevanter Unterschied im Körpergewicht der *Dlg5^{ΔIEC}* Mäuse im Vergleich zu dem der Wildtyp Mäuse ($p < 0,934$).

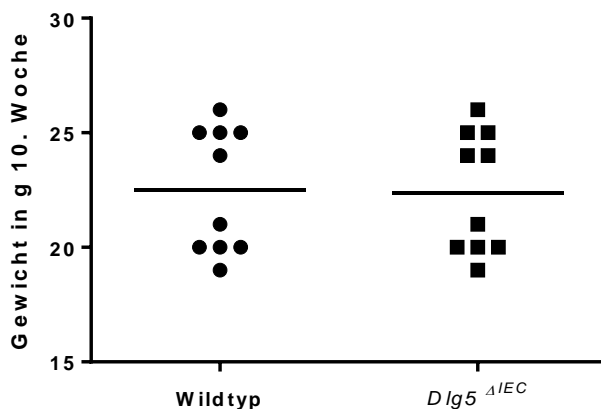


Abbildung 5: Kein signifikanter Unterschied im Gewicht der *Dlg5^{ΔIEC}* und Wildtyp Mäuse nach 10 Wochen in der basalen Phänotypisierung

Abgebildet sind die Körpergewichte von jeweils $n = 10$ Mäusen pro Genotyp mit den Mittelwerten.

3.2.2 Kolonlänge

Die Kolonlänge wurde ebenfalls von 10 Wochen alten Tieren gemessen, um mögliche Auswirkungen des konditionalen *Dlg5* Knockouts auf die intestinale Anatomie festzustellen.

Bei den *Dlg5^{ΔIEC}* Mäusen maß die Länge des Kolons durchschnittlich $10,0 \pm 0,58$ cm, bei den Wildtyp Mäusen hatte das Kolon eine Länge von $10,1 \pm 0,61$ cm.

Also zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied bezüglich der Darmlängen bei den *Dlg5^{ΔIEC}* Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen ($p < 0,712$).

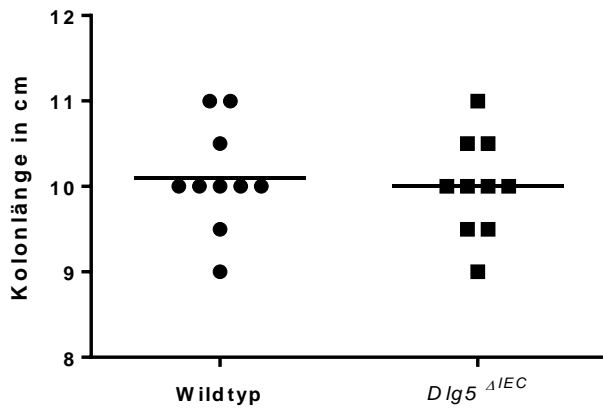


Abbildung 6: Kein signifikanter Unterschied in den Kolonlängen beider Mausgruppen in der basalen Phänotypisierung

Dargestellt sind jeweils die Kolonlängen von n = 10 Mäusen mit den Mittelwerten jeweils der *Dlg5*^{ΔIEC} und Wildtyp Mäuse.

3.2.3 Histologische Untersuchung

Schließlich erfolgte die histologische Aufarbeitung von Ileum- und Kolonpräparaten.

Die Ileumpräparate sowohl der *Dlg5*^{ΔIEC} Mäuse als auch der Wildtyp Mäuse zeigten einen regulären Wandaufbau mit Mukosa, Submukosa und Muskularis. Das Zylinderepithel der Mukosa sowie die Struktur der Zotten und Krypten waren regelhaft. Es zeigte sich ein normales Zellbild mit Enterozyten, Becherzellen und Panethzellen sowie Zellen der Immunabwehr, wie Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten. Des Weiteren fanden sich sogenannte Peyer-Plaques, welche Ansammlungen von Lymphfollikeln in der *Lamina propria mucosae* sind (Lüllmann-Rauch 2003).

Auch bei den Präparaten des Kolons ergaben sich im histologischen Bild keine Unterschiede bei der basalen Phänotypisierung zwischen den *Dlg5*^{ΔIEC} Mäusen und den Wildtyp Mäusen. Es zeigte sich ein regulärer Wandaufbau mit Mukosa, Submukosa und Muskularis. Das einschichtige Zylinderepithel wies eine hohe Anzahl von Becherzellen auf. In der *Lamina propria* zeigten sich solitäre Lymphfollikel, jedoch, wie zu erwarten, kaum Zellen der Immunabwehr.

Diese Befunde zeigen, dass die Deletion von *Dlg5* zu keinen offensichtlichen Veränderungen des histologischen Aufbaus der Darmwand weder im Ileum noch im Kolon führt.

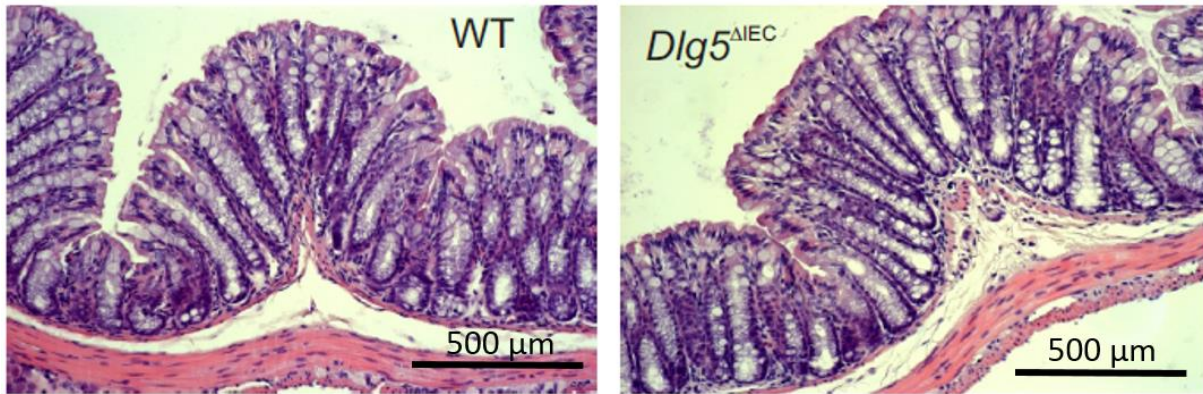


Abbildung 7: HE-gefärbte Längsschnitte von Kolonpräparaten mit regulärem Wandaufbau

Abgebildet sind zwei HE-gefärbte Kolonpräparate jeweils einer Wildtyp und einer *Dlg5^{ΔIEC}* Maus. Beide Abbildungen zeigen einen Normalbefund ohne Nachweis entzündlicher Veränderungen im Sinne einer spontanen Colitis.

3.3 Induktion einer Colitis bei *Dlg5^{ΔIEC}* und Wildtyp Mäusen mittels DSS-Gabe

Nach der basalen Phänotypisierung der *Dlg5^{ΔIEC}* Mäuse erfolgte die Induktion einer Colitis im DSS-Experiment wie im Material und Methoden Teil beschrieben.

Im Folgenden wurden verschiedene Parameter bestimmt um das Ausmaß und die Schwere der Colitis zu beurteilen.

3.3.1 Klinischer Befund im DSS-Experiment

3.3.1.1 Überlebenskurve

Zunächst wurde die Letalität der Mäuse während des Experimentes untersucht. Hierzu wurden, neben den während des Experimentes verstorbenen Mäusen, auch die Mäuse gezählt, die aufgrund eines vorgegebenen Abbruchgewichtes ($\leq 20\%$ des Ausgangsgewichtes) oder eines schlechten Allgemeinzustandes (Absonderung von der Gruppe, struppiges Fell, kauern, krummer Rücken) getötet werden mussten.

Bei den Wildtyp Mäusen kam es erst zum Ende des Experimentes zu einer erhöhten Sterblichkeit. Bis Tag 19 lag die Überlebenskurve bei 100%. Am Tag 20 verstarb eine Maus (90,9% Überleben) und an Tag 21 zwei Mäuse, sodass die Überlebenskurve am Ende des

Experimentes bei 72,73% lag. Alle drei Mäuse mussten aufgrund ihres Abbruchgewichtes getötet werden.

Bei den $Dlg5^{AIEC}$ Mäusen kam es bereits an Tag 9 zu einem Abfall der Überlebenskurve auf 93,91%, zuvor lag das Überleben bei 100%. An Tag 19 mussten weitere 2 Mäuse getötet werden, sodass die Überlebenskurve bei 80,0% lag. Am Folgetag mussten 3 weitere Mäuse aufgrund ihres Abbruchgewichtes getötet werden (Überleben 60,0%) und an Tag 21 lag die Überlebenskurve schließlich bei 53,33%. Insgesamt verstarb eine der 7 Mäuse, die anderen 6 Mäuse mussten aufgrund des Abbruchgewichtes getötet werden.

Zusammengefasst lag die Überlebenskurve bei den Wildtyp deutlich höher als bei den $Dlg5^{AIEC}$ Mäusen (72,73% vs. 53,33%), was auf eine erhöhte Suszeptibilität der $Dlg5^{AIEC}$ Mäuse für das DSS hindeutet.

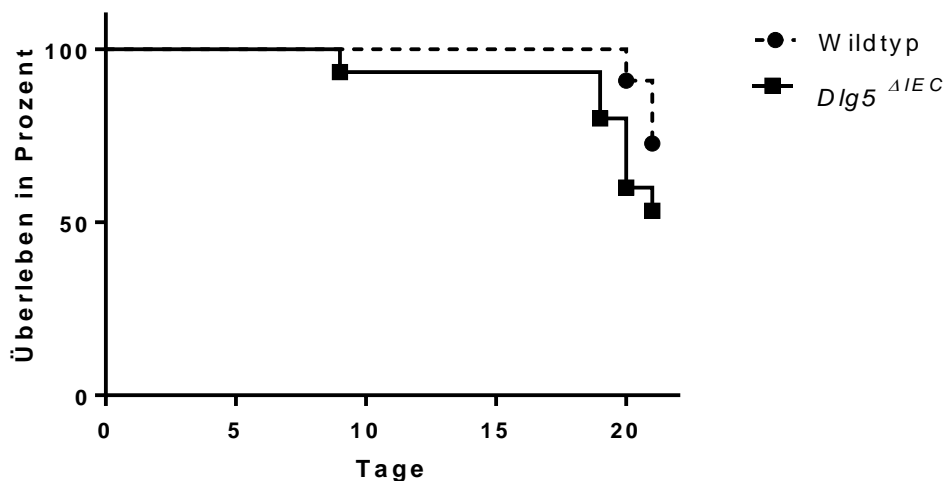


Abbildung 8: Deutlich erhöhte Mortalität in der Gruppe der $Dlg5^{AIEC}$ Mäuse im DSS-Experiment

3.3.1.2 Gewichtsverlauf

Als weiterer Parameter zur Beurteilung des klinischen Krankheitsverlauf der Mäuse während des Experimentes wurde alle zwei Tage und ab Tag 17 täglich das Körpergewicht der Mäuse bestimmt.

Das durchschnittliche Gewicht der Wildtyp Mäuse stieg zunächst konstant von dem durchschnittlichen Ausgangsgewicht (100%) in den ersten 5 Tagen auf $105,18 \pm 2,49\%$ an. Nach einem Gewichtsabfall auf $99,56 \pm 3,03\%$ des Ausgangsgewichtes an Tag 7, stieg das

durchschnittliche Gewicht bis Tag 13 wieder kontinuierlich an ($106,59 \pm 4,85\%$ des Ausgangsgewichtes). Ab Tag 15 kam es dann im Verlauf zu einem kontinuierlichen Gewichtsverlust bis zum Ende der Messung an Tag 21 auf durchschnittlich $90,37 \pm 12,42\%$ des Ausgangsgewichtes.

Die *Dlg5^{AIEC}* Mäuse zeigten zunächst auch in den ersten 5 Tagen eine kontinuierlichen Gewichtszunahme auf $103,79 \pm 3,35\%$ des Ausgangsgewichtes ($p < 0,259$). Ab Tag 7 kam es dann, wie bei den Wildtyp Mäusen ebenfalls zu einem Gewichtsverlust, der jedoch bis zum 9. Tag anhielt ($98,83 \pm 7,82\%$, $p < 0,223$). Zwischen Tag 11 und 13 konnte zunächst wieder eine Gewichtszunahme auf $102,79 \pm 9,12\%$ des Ausgangsgewichtes verzeichnet werden; ab Tag 15 fiel das Gewicht bis zum Ende der Messung an Tag 21 wieder kontinuierlich bis auf $83,18 \pm 11,17\%$ ($p < 0,135$) des Ausgangsgewichtes ab. Bei den *Dlg5^{AIEC}* Mäusen war insbesondere zwischen Tag 15 und Tag 19 ein starker Gewichtsverlust im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen zu verzeichnen: an Tag 17 lag das durchschnittlich Gewicht der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse bei $94,98 \pm 7,97\%$ des Ausgangsgewichtes (Gewicht der Wildtyp Mäuse $101,57 \pm 3,73\%$, $p < 0,018$), an Tag 18 bei $91,28 \pm 8,41\%$ (Gewicht der Wildtyp Mäuse bei $98,28 \pm 4,41\%$; $p < 0,019$) und an Tag 19 bei $86,40 \pm 7,92\%$ (Gewicht der Wildtyp Mäuse bei $92,80 \pm 6,39\%$, $p < 0,037$). Somit zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied in der Gewichtsabnahme im Zeitraum von Tag 17 bis 19 zwischen den Wildtyp und *Dlg5^{AIEC}* Mäusen.

An Tag 20 und 21 zeigte sich kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Mausgruppen ($p < 0,115$ Tag 20 und $p < 0,135$ Tag 21).

Die angegebenen Gewichtsabnahmen in den beiden Mausgruppen jeweils an Tag 7 und Tag 15 korrelierten mit der Gabe/Wirkung von DSS. Die dazwischen liegende Regeneration ab Tag 9 entsprach der Gabe von normalem Trinkwasser ohne DSS.

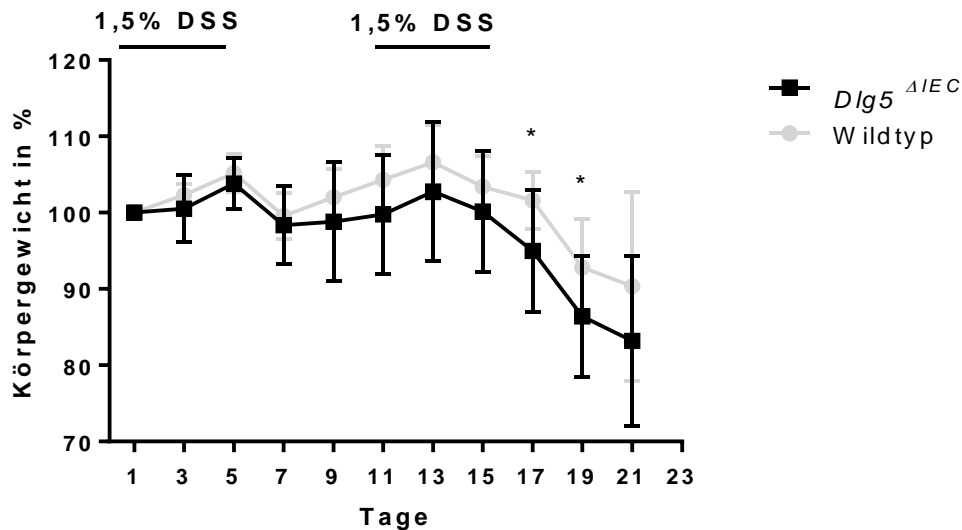


Abbildung 9: Stärkere Gewichtsabnahme während des DSS-Experiment in der Gruppe der *Dlg5^{ΔIEC}* Mäuse

Die Abbildung zeigt den Gewichtsverlauf beider Mausgruppen in Prozent über den Zeitraum des DSS-Experimentes mit signifikanten Unterschied an Tag 17 und 19.

Abgebildet sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung.

3.3.1.3 Disease Activity Index

Um die Schwere der Colitis beurteilen zu können, wurde der im Material und Methoden Teil beschriebene *Disease Activity Index*, DAI, (Siegmond et al. 2001a) bestimmt. Dieser bezog den Körpergewichtsverlust, die Stuhlkonsistenz und den perianalen Blutabgang mit ein. Die angegebenen Parameter wurden an Tag 15 des Experiments erhoben und daraus der DAI-Score errechnet.

Der DAI-Score der Wildtyp Mäuse lag durchschnittlich bei $4,95 \pm 1,11$ Punkten. Die *Dlg5^{ΔIEC}* Mäuse wiesen eine DAI-Score von durchschnittlich $5,13 \pm 2,66$ Punkten auf. Somit bestand an Tag 15 des Experimentes kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen ($p < 0,836$).

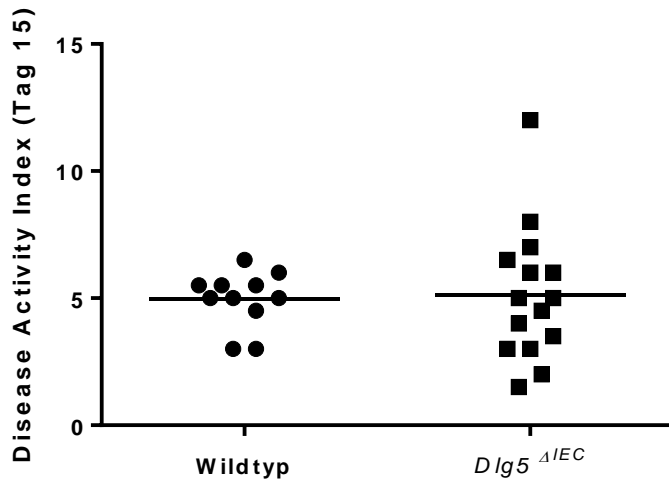


Abbildung 10: *Kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Colitis in den beiden Mausgruppen am 15. Tag des Experimentes*

Abgebildet ist der DAI an Tag 15 während des DSS-Experimentes mit $n = 11$ bzw. 15 Mäusen mit den jeweiligen Mittelwerten.

3.3.2 Befunde der *ex vivo* Untersuchungen im DSS-Experiment

Im Anschluss an die klinischen Untersuchungen erfolgte die Tötung der Mäuse und die Organ- und Gewebeentnahme für weitere Analysen.

Dieses diente der genaueren Beurteilung sowohl von makroskopischen als auch von mikroskopischen Veränderungen der verschiedenen Gewebe, die unter der induzierten Colitis auftraten.

3.3.2.1 Untersuchung der Organpräparate im DSS-Experiment

3.3.2.1.1 Kolonlänge

Zunächst wurde die Kolonlänge bestimmt. Hier zeigte sich bei den Wildtyp Mäusen eine durchschnittliche Kolonlänge von $6,86 \pm 0,63$ cm. Die Kolonlänge der *Dlg5^{ΔIEC}* Mäuse lag durchschnittlich bei $6,27 \pm 0,73$ cm und war damit signifikant kürzer ($p < 0,041$).

Insgesamt zeigte sich bei der Bestimmung der Kolonlänge im DSS-Experiment im Vergleich zu den Ergebnissen der basalen Phänotypisierung ebenfalls ein signifikanter Unterschied (Wildtyp Mäuse durchschnittlich 10,1 cm vs. 6,86 cm, $p < 0,001$; *Dlg5^{ΔIEC}* Mäuse durchschnittlich 10,0 cm vs. 6,27 cm, $p < 0,0001$).

3.3.2.1.2 Zoekungewicht

Als nächstes wurde das Gewicht des Zoekums bestimmt. Das durchschnittliche Gewicht des Zoekums lag bei den Wildtyp Mäusen bei $0,74 \pm 0,26$ g und bei den *Dlg5^{ΔIEC}* Mäusen bei $0,47 \pm 0,13$ g ($p < 0,006$). Somit ergab sich hier ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Mausgruppen.

3.3.2.1.3 Milzgewicht

Das Milzgewicht lag bei der Gruppe der Wildtyp Mäusen durchschnittlich bei $0,08 \pm 0,03$ g und bei den bei $0,07 \pm 0,03$ g ($p < 0,526$). Hieraus ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp und *Dlg5^{ΔIEC}* Mäusen.

3.3.2.1.4 Lebergewicht

Bei den Wildtyp Mäusen ergab sich ein durchschnittliches Gewicht der Leber von $0,92 \pm 0,19$ g. Das durchschnittliche Gewicht der Leber bei den *Dlg5^{ΔIEC}* Mäusen lag bei $0,90 \pm 0,13$ g und zeigte daher keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen ($p < 0,824$).

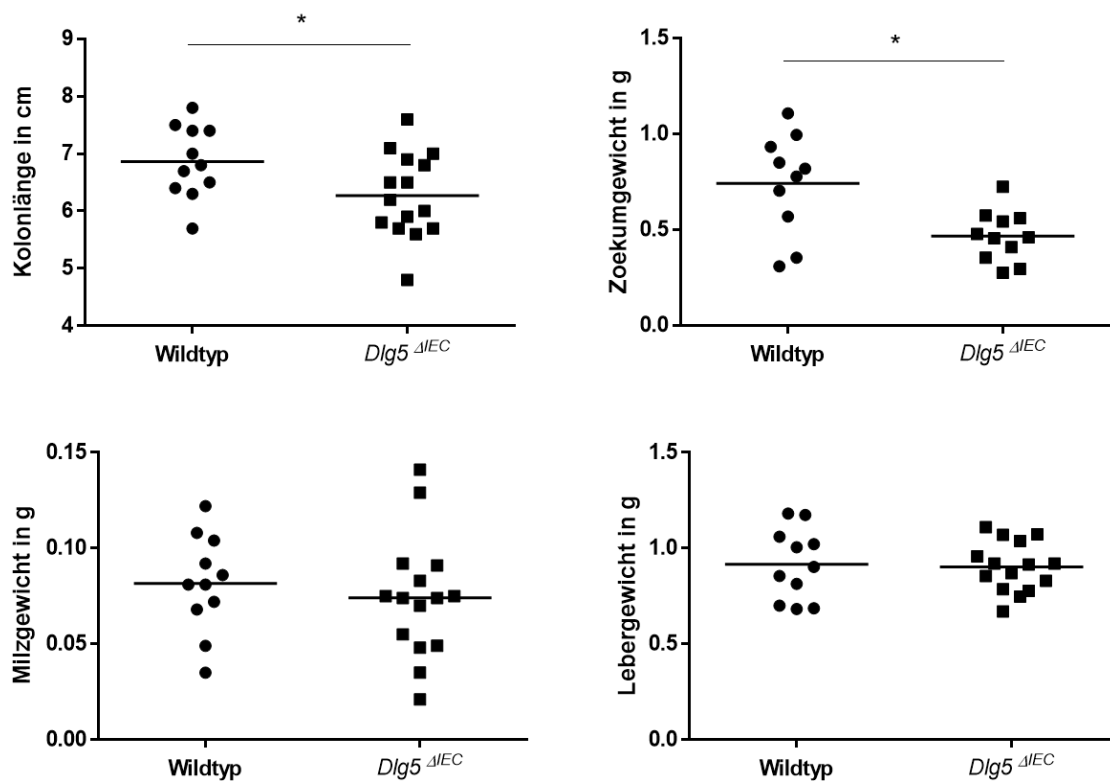


Abbildung 11: Bestimmung der Kolonlänge bzw. des Organgewichts der Wildtyp und *Dlg5*^{ΔIEC} Mäuse im DSS-Experiment

Abgebildet ist die Kolonlänge, das Zökum-, Milz- und Lebergewicht mit $n = 11$ bzw. 15 Mäusen mit jeweils den Mittelwerten. Es zeigt sich eine signifikante Verkürzung der Kolonlänge und ein signifikant geringeres Zökumgewicht bei den *Dlg5*^{ΔIEC} Mäusen im DSS Experiment. Keine Unterschiede des Milz- und Lebergewichtes in beiden Mausgruppen.

3.3.2.2 Histologische Untersuchungen von Gewebeproben im DSS-Experiment

Für die histologische Aufarbeitung der Gewebeproben von den *Dlg5*^{ΔIEC} Mäusen und den Wildtyp Mäusen wurden HE-Färbungen angefertigt und mithilfe eines histologischen Scores mikroskopisch beurteilt (Siegmund et al. 2001a). Der Score beinhaltete sowohl die Beurteilung von Entzündungszellinfiltraten als auch von Gewebeschäden.

Die Kolonpräparate der *Dlg5*^{ΔIEC} Mäuse zeigten teilweise ausgeprägte Entzündungsinfiltrate mit hauptsächlich Granulozyten sowie Lymphozyten und Makrophagen. Daneben zeigten sich zahlreiche Kryptenabszesse, Mukosaulzerationen und Schädigungen tieferer Wandstrukturen. Der histologische Score lag bei $9,3 \pm 2,5$ Punkten.

Auch in den Darmpräparaten der Wildtyp Mäuse lag eine teilweise ausgeprägte Entzündungsreaktion mit Entzündungszellinfiltraten und Kryptenabszessen vor. Der histologische Score lag bei $6,0 \pm 2,3$ Punkten.

Anhand des histologischen Scores für das gesamte Kolon konnte somit ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen festgestellt werden ($p < 0,002$).

Wildtyp Maus



Dlg5^{ΔIEC} Maus

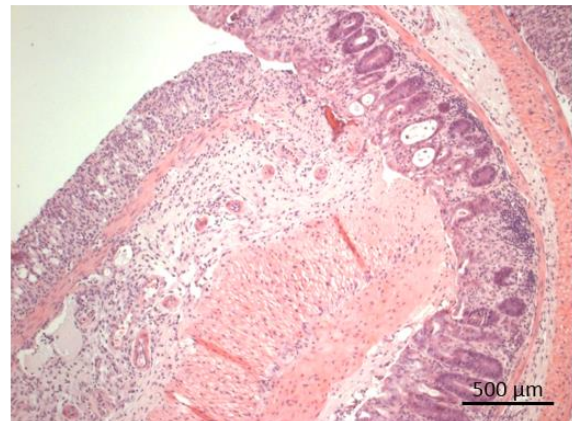
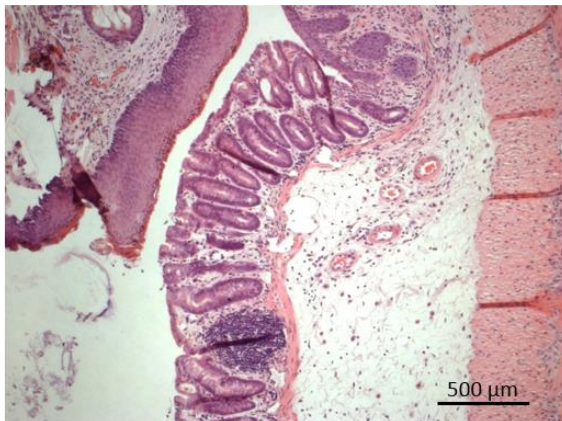


Abbildung 12: HE-gefärbte Kolonschnitte von einer Wildtyp (links) und *Dlg5^{ΔIEC}* Maus (rechts)

Abgebildet ist jeweils oben ein Übersichtsbild und in der unteren Reihe eine Detailaufnahme des distalen Kolons.

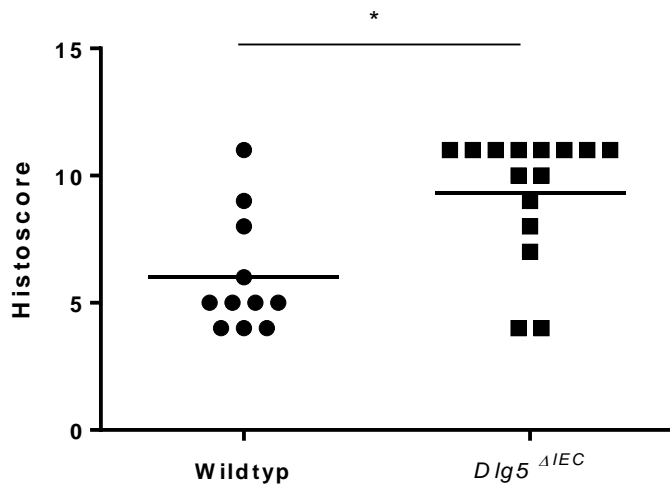


Abbildung 13: Signifikanter Unterschied bei der histologischen Auswertung der Kolonpräparate zwischen den Mausgruppen im DSS-Experiment

Abgebildet ist der histologische Score mit $n = 11$ bzw. 15 Mäusen pro Genotyp mit den errechneten Mittelwerten.

3.3.2.3 Epithelverlust

Da in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen das Epithel, durch seine Barrierefunktion und durch seine Funktion innerhalb des angeborenen Immunsystems, eine wichtige Rolle zu spielen scheint, wurde das Epithel in der histologischen Analyse nochmals genauer betrachtet. Hierbei wurde das Ausmaß der Epithelschädigung prozentual beurteilt und mit einer entsprechenden Punktzahl bewertet. Bei der Gruppe der $Dlg5^{\Delta IEC}$ Mäuse ergab sich bei dem Kolonepithel eine Punktzahl von $4,7 \pm 2,7$, und bei dem Zoekumepithel eine Punktzahl von $3,9 \pm 3,0$.

Die Beurteilung des Kolonepithels ergab bei den Wildtyp Mäusen ein Punktzahl von durchschnittlich $2 \pm 2,2$ und bei dem Zoekumepithel eine Punktzahl von $1 \pm 0,8$. Somit ergab sich sowohl bei der Untersuchung des Kolon- als auch des Zoekumepithels ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen im Sinne einer ausgeprägteren Epithelschädigung bei den $Dlg5^{\Delta IEC}$ Mäuse (Kolonepithel $p < 0,03$; Zoekumepithel $p < 0,025$).

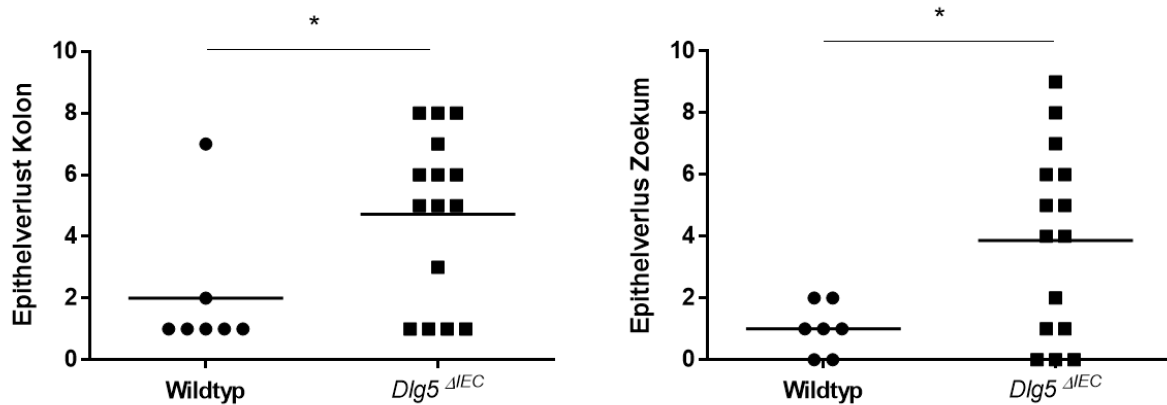


Abbildung 14: Signifikanter Unterschied bei der Beurteilung des Kolon- und Zoekumepithels zwischen den Mausgruppen im DSS-Experiment

Abgebildet ist der mit entsprechender Punktzahl bewertete Epithelverlust von Kolon und Zoekum mit $n = 7$ bzw. 15 Mäusen pro Genotyp mit den errechneten Mittelwerten.

3.3.2.4 TUNEL Färbung

Eine erhöhte Apoptoserate kann ebenfalls die Integrität des Epithels beeinträchtigen, weswegen neben der allgemeinen histologischen Beurteilung mittels des histologischen Scores und der Beurteilung der Epithelschädigung zusätzlich noch mittels TUNEL-Färbung die Anzahl der apoptotischen Zellen im Ileumepithel ermittelt wurde. Hierbei ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen: die durchschnittliche Zahl von TUNEL-positiven Zellen lag bei den Wildtyp-Mäusen bei $0,37 \pm 0,15$ pro 10 Krypten, wohingegen die Zahl bei den *Dlg5^{ΔIEC}* Mäusen bei $1,35 \pm 0,53$ pro 10 Krypten lag ($p < 0,029$).

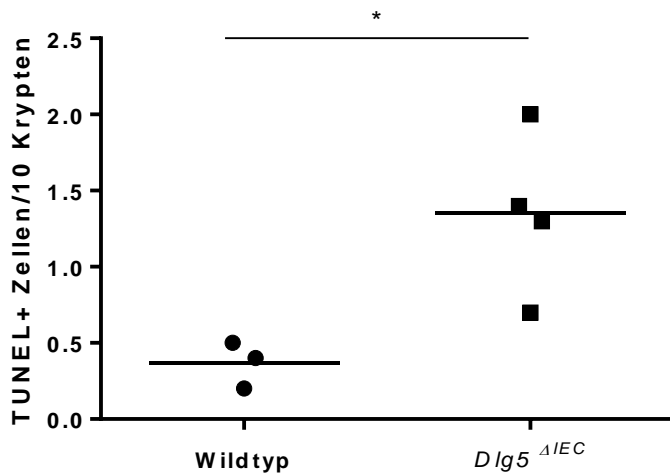
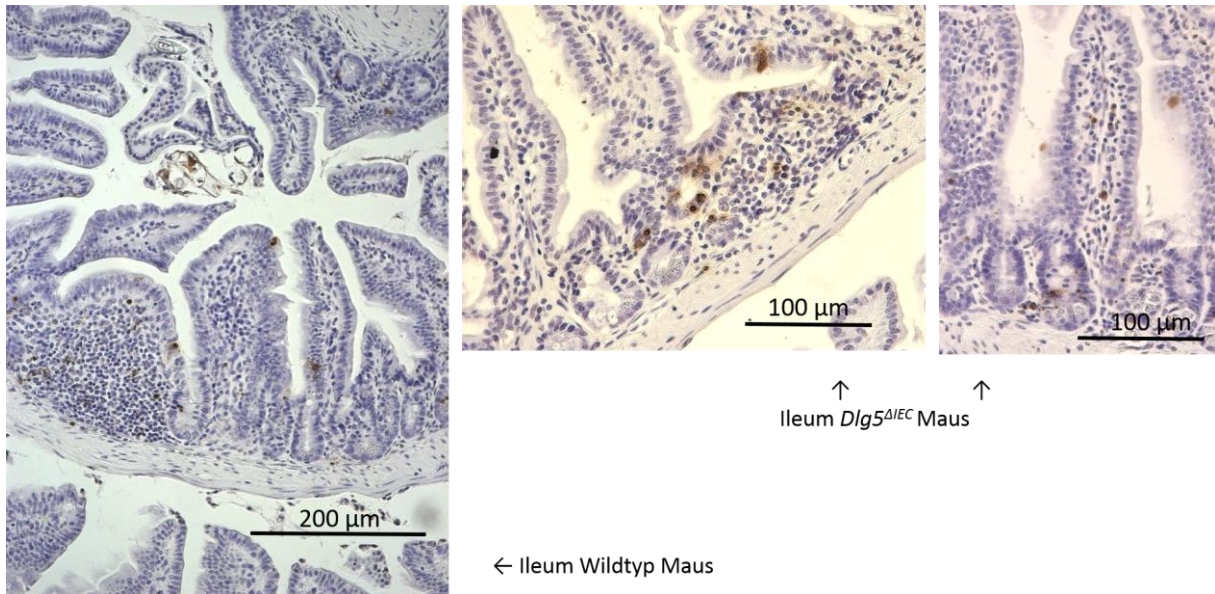


Abbildung 15: Signifikant mehr TUNEL-positive Zellen bei den *Dlg5*^{ΔIEC} Mäusen

Abgebildet sind TUNEL-gefärbte Dünndarmschnitte beider Mausgruppen sowie die ausgezählten TUNEL-positiven Zellen pro 10 Krypten mit n = 3 bzw. 4 Mäusen der beiden Genotypen mit den errechneten Mittelwerten.

3.3.2.5 Multiplex Analysen

Zusätzlich zu den oben genannten histologischen Untersuchungen zur Beurteilung des Zellbildes während des Entzündungsprozesses wurden auch Botenstoffe des Abwehrsystems, sogenannte Zytokine, in Serumproben beider Mausgruppen untersucht. Diese Untersuchungen wurden durch die Firma Bioglobe Hamburg mit *Bio-Plex ProTM Mouse Cytokine 23-plex Assay* der Firma Biorad mit der Luminex-Technologie durchgeführt. Untersucht wurden die

Zytokine Interleukin-1 β (Il-1 β), Interleukin-6 (Il-6), *keratinocyte chemoattractant* (KC), Interleukin-10 (Il-10), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ) und Makrophagen-Inflammatorisches Protein-1 α (MIP-1 α).

Diese Zytokine werden hauptsächlich von Zellen des Immunsystems synthetisiert (überwiegend Makrophagen/Monozyten und T-Helferzellen) aber auch zum Teil von aktivierten Epithelzellen und dienen auf unterschiedliche Weise der interzellulären Kommunikation im Sinne von Mediatoren in immunologischen Reaktionen und Entzündungsprozessen. Eine Erhöhung der Zytokinspiegel würde somit für ein entzündliches Geschehen in den Tieren hindeuten.

3.3.2.5.1 Interleukin-1 β

In den Proben der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse lag der durchschnittlich errechnete Wert der Il-1 β Konzentration bei $364 \pm 112,1$ pg/ml. Die Konzentration von Il-1 β betrug bei den Proben der Wildtyp Mäuse durchschnittlich $313 \pm 54,79$ pg/ml. Somit bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen ($p < 0,391$).

3.3.2.5.2 Interleukin-6

Die Konzentration von Il-6 lag bei den Proben der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse durchschnittlich bei 412 ± 1156 pg/ml, in den Proben der Wildtyp Mäuse entsprechend bei $3,44 \pm 4,6$ pg/ml. Hieraus ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen ($p < 0,255$).

3.3.2.5.3 *Keratinocyte chemoattractant* (KC)

In den Proben der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse lag der durchschnittlich errechnete Wert der KC Konzentration bei $203,6 \pm 353,6$ pg/ml. Die Konzentration von KC betrug bei den Proben der Wildtyp Mäuse durchschnittlich $43,63 \pm 33,06$ pg/ml. Somit bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen ($p < 0,311$).

3.3.2.5.4 Interleukin-10

Die Konzentration von Il-10 betrug bei den Proben der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse durchschnittlich $114,1 \pm 217,9$ pg/ml. In den Proben der Wildtyp Mäuse lag der durchschnittlich errechnete Wert der Il-10 Konzentration bei $57,34 \pm 17,56$ pg/ml. Hieraus ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen ($p < 0,4$).

3.3.2.5.5 Tumornekrosefaktor- α

In den Proben der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse lag der durchschnittlich errechnete Wert der TNF- α Konzentration bei $430,9 \pm 186,8$ pg/ml. Die Konzentration von der TNF- α ergab bei den Proben der Wildtyp Mäuse einen durchschnittlichen Wert von $466,3 \pm 274,8$ pg/ml. Somit bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen ($p < 0,699$).

3.3.2.5.6 Interferon- γ

Die Konzentration von IFN- γ betrug bei den Proben der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse durchschnittlich $9,93 \pm 5,35$ pg/ml. In den Proben der Wildtyp Mäuse lag der durchschnittlich errechnete Wert der IFN- γ Konzentration bei $9,25 \pm 4,49$ pg/ml. Hieraus ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen ($p < 0,732$).

3.3.2.5.7 Makrophagen-Inflammatorisches Protein-1 α

In den Proben der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse betrug der durchschnittlich errechnete Wert des MIP-1 α Konzentration $31,29 \pm 8,98$ pg/ml. Die Konzentration vom MIP-1 α lag bei den Proben der Wildtyp Mäuse bei $25,74 \pm 3,10$ pg/ml. Somit ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den *Dlg5^{AIEC}* und Wildtyp Mäusen ($p < 0,062$).

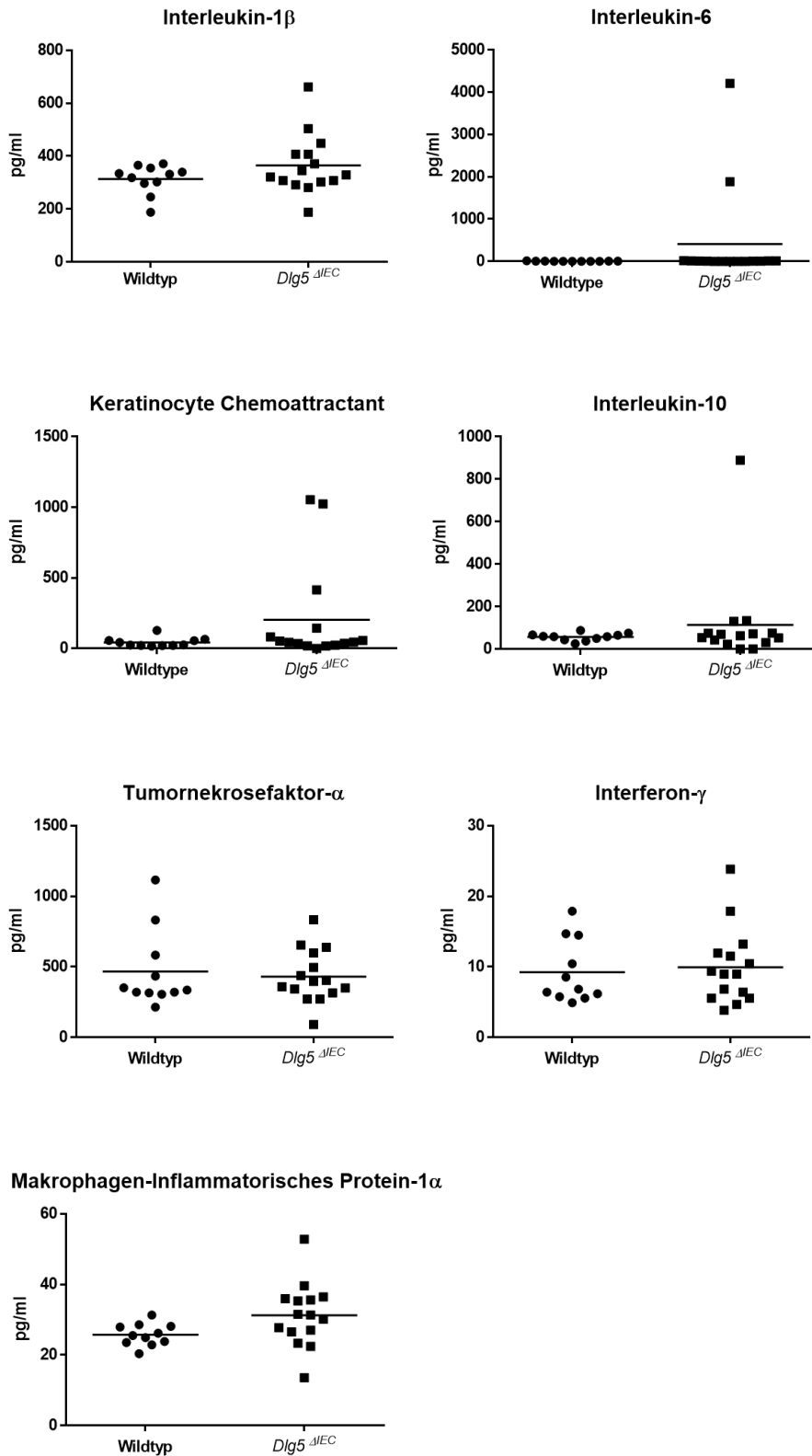


Abbildung 16: Keine Unterschiede in den mittels Multiplex analysierten Zytokinkonzentrationen bei den Wildtyp und *Dlg5*^{ΔIEC} Mäusen am Ende des DSS-Experiments

Abgebildet sind die einzelnen Multiplex Analysen der Zytokine mit n = 11 bzw. 15 Mäusen der beiden Genotypen mit den errechneten Mittelwerten.

3.3.2.5.8 ELISA

Ergänzend zu den Multiplex-Analysen wurde auch noch ein KC-ELISA durchgeführt, dessen Ergebnisse mit den Ergebnissen der Multiplex-Analyse übereinstimmten. Bei den Proben der *Dlg5^{ΔIEC}* Mäuse lag die durchschnittliche KC-Konzentration bei 1208 ± 1201 pg/ml. Bei den Proben der Wildtyp Mäusen wurde diese bei durchschnittlich $954,8 \pm 968,1$ pg/ml gemessenen, sodass diese Ergebnisse den Befund aus dem Multiplex Assay bestätigten.

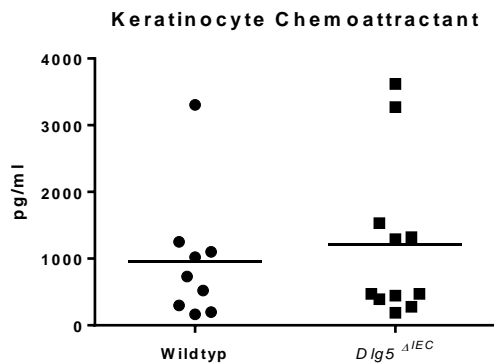


Abbildung 17: Kein Unterschied beim KC-ELISA zwischen den Wildtyp und *Dlg5^{ΔIEC}* Mäusen am Ende des DSS-Experiments

Abgebildet ist die gemessene Konzentration von KC mit $n = 9$ bzw. 11 Mäusen der beiden Genotypen mit den errechneten Mittelwerten.

3.3.2.6 Taqman-Analysen zur Genexpression von Zytokinen

Schließlich wurde auch das Kolon- und Zoekumgewebe auf die Expression von Genen untersucht, die für Entzündungsmediatoren kodieren. Hierfür wurde eine RT-PCR nach dem Taqman-Prinzip verwendet. Das Expressionslevel des jeweiligen Gens wurde auf die Expression des *housekeeping*-Gens β -Actin normiert.

3.3.2.6.1 Interleukin-1 β

Die gemessene Genexpression von Interleukin-1 β in dem Kolongewebe der *Dlg5^{ΔIEC}* Mäuse lag durchschnittlich bei $21,02 \pm 21,85$ ohne signifikanten Unterschied zu der gemessenen Expression, die im Kolongewebe der Wildtyp Mäuse gemessen wurde (durchschnittlich $28,82 \pm 29,88$, $p < 0,53$).

Auch wenn im Zoekumgewebe der beiden Mausgruppen kein signifikanter Unterschied bestand, war aber die Expression von Il-1 β bei den *Dlg5^{AIEC}* Mäusen höher ($0,05 \pm 0,05$) als bei den Wildtyp Mäusen ($0,03 \pm 0,02$, $p < 0,07$).

3.3.2.6.2 Interleukin-6

Auch bei der Genexpression von Interleukin-6 ergab sich in beiden Mausgruppen sowohl im Kolongewebe (*Dlg5^{AIEC}* Mäuse $2,97 \pm 4,65$, Wildtyp Mäuse $12,89 \pm 32,32$, $p < 0,242$) als auch im Zoekumgewebe (*Dlg5^{AIEC}* Mäuse $0,09 \pm 0,05$, Wildtyp Mäuse $0,007 \pm 0,007$, $p < 0,530$) kein signifikanter Unterschied. Jedoch lag in diesem Fall die Genexpression von Il-6 im Zoekumgewebe der Wildtyp Mäuse deutlich über dem Wert der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse.

3.3.2.6.3 Keratinocyte chemoattractant

Die Expression von *keratinocyte chemoattractant* war im Zoekumgewebe der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse etwas höher ($0,101 \pm 0,195$) als die Expression im Zoekumgewebe der Wildtyp Mäuse ($0,042 \pm 0,04$), jedoch ohne signifikanten Unterschied ($p < 0,887$). Auch im Kolongewebe ergab die Expression von KC keinen signifikanten Unterschied ($4,521 \pm 7,71$ bei den *Dlg5^{AIEC}* Mäusen, $23,22 \pm 63,07$ bei den Wildtyp Mäusen, $p < 0,37$).

3.3.2.6.4 Tumornekrosefaktor- α

Sowohl im Kolon- als auch im Zoekumgewebe der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse war die Genexpression von TNF- α im Vergleich zu den Gewebeproben der Wildtyp Mäuse leicht erhöht; im Kolon lag die Expression bei den *Dlg5^{AIEC}* Mäusen bei $0,552 \pm 0,29$, bei den Wildtyp Mäuse bei $0,466 \pm 0,326$. Im Zoekum betrug die Expression von TNF- α bei den *Dlg5^{AIEC}* Mäusen $0,009 \pm 0,005$, bei den Wildtyp Mäusen $0,007 \pm 0,007$. In beiden Geweben lag aber kein signifikanter Unterschied vor (Kolon: $p < 0,37$; Zoekum $p < 0,887$).

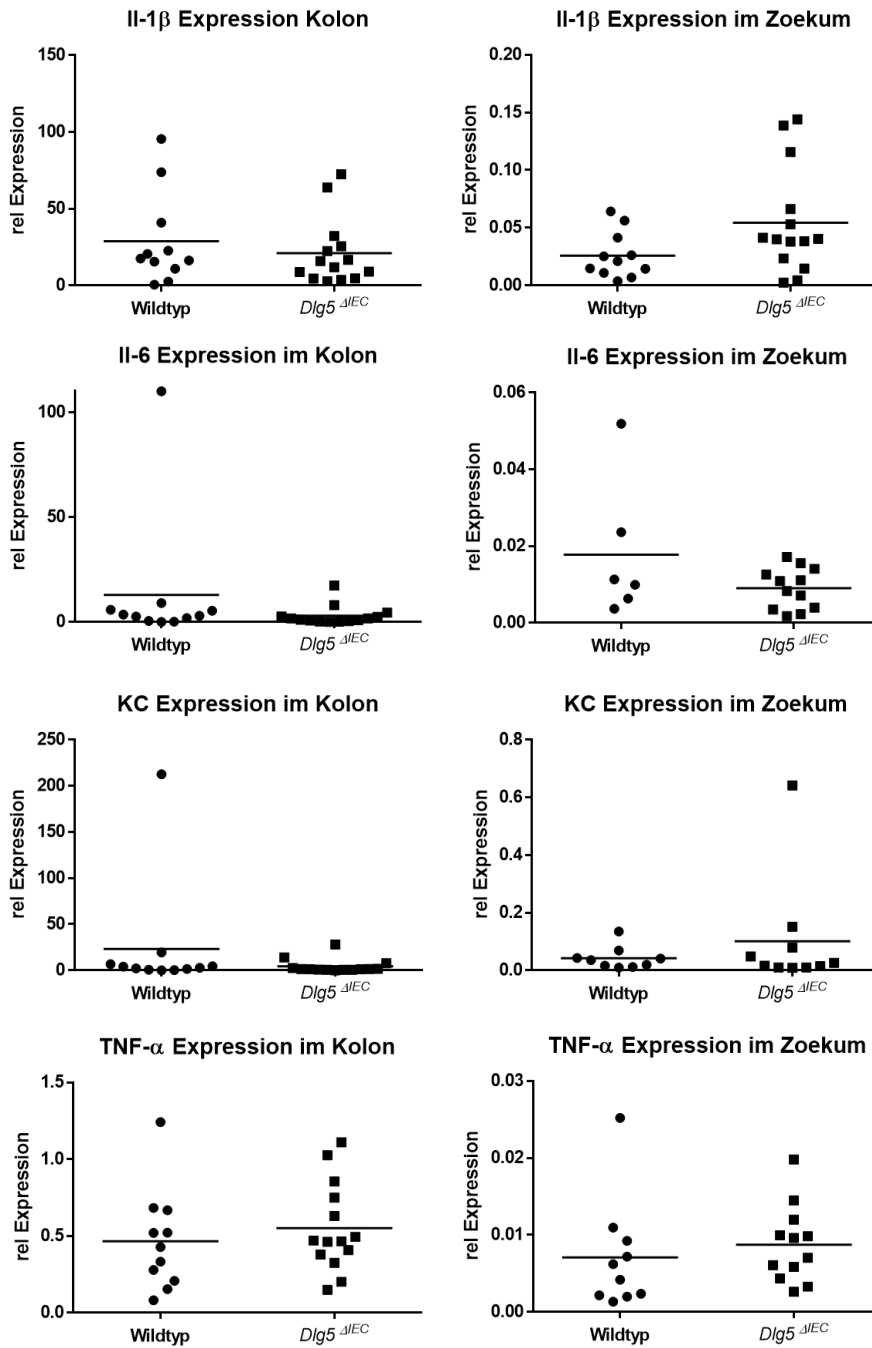


Abbildung 18: Keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression der Zytokine zwischen den Mausgruppen

Abgebildet sind die Genexpressionsanalysen der Zytokine mit jeweils n = 11 bzw. 15 Mäusen und den errechneten Mittelwerten.

3.3.3 Bestimmung von phosphoryliertem ERK in siRNA gegen DLG5 behandelten HeLa Zellen

Ein ergänzendes Experiment zur Untersuchung der Vorgänge eines *DLG5* Knockouts auf molekularer Ebene erfolgte mithilfe von epithelialen Zellkulturen, in diesem Fall mit HeLa Zellen. Hierbei wurde in den Zellen ein „*Knock-Down*“ von *DLG5* durch die Transfektion von entsprechender siRNA generiert. Die Zellen wurden dann für 30 min mit 30 ng/ml TNF- α stimuliert und im Anschluss die Menge an *extracellular signal regulated kinase* (ERK) und phosphoryliertem ERK mittels Westernblot-Technik bestimmt. ERK ist ein wichtiger Bestandteil des MAP-Kinase Signalwegs, der durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung (aktiv/inaktiv) wichtige Funktionen wie Zellproliferation und Zellregeneration steuert.

Hierbei zeigte sich in den transfizierten Zellen unabhängig vom Stimulus TNF- α eine deutlich erhöhte Konzentration von phosphoryliertem ERK im Vergleich zu der Kontrolle. Demnach führte ein durch siRNA induzierter Knockout von *DLG5* in HeLa Zellen auf molekularer Ebene zur verstärkten Phosphorylierung des MAP/ERK Signalweges.

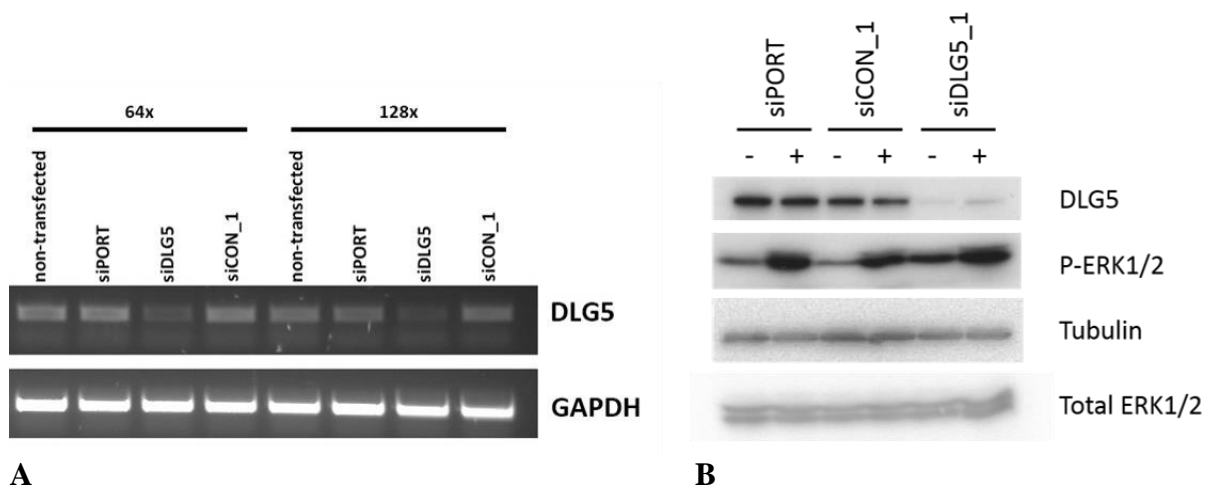


Abbildung 19: Erhöhte Konzentration an phosphoryliertem ERK in mit siRNA gegen *DLG5* behandelten HeLa Zellen

A RT-PCR mit 64-fach bzw. 128-fach verdünnter cDNA mit Nachweis der *DLG5* Deletion in den HeLa Zellen; Spalten von links nach rechts: keine Transfektion, Transfektion mit dem Transfektionsreagenz siPORT, Transfektion mit siDLG5, Transfektion mit der Kontrollsequenz siCON-1; als Kontrolle in der unteren Zeile diente das *housekeeping*-Gen *GAPDH*.

B Bestimmung von phosphoryliertem ERK in den *DLG5*-Knockout Zellen nach vorheriger Stimulation mit 30 ng/ml TNF- α für 30 min mittels Westernblot-Technik; die obere Zeile zeigt zudem die Bestimmung von *DLG5* auf Proteinebene; abgebildet ist jeweils eine Probe nach TNF- α Stimulation (+) bzw. ohne TNF- α Stimulation (-) der jeweiligen siRNA; zur Kontrolle diente das *housekeeping*-Protein Tubulin.

4 Diskussion

Die Ätiologie von M. Crohn und Colitis ulcerosa, konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden. Jedoch kann in vielen Studien gezeigt werden, dass bei diesen Krankheitsbildern eine polygenetische Ätiologie der Pathogenese vorliegt (Hampe et al. 2001, Stoll et al. 2004, Schreiber et al. 2005). Zu den relevanten Genen in diesem Zusammenhang zählen z.B. *NOD2* und *ATG16L1*, sowie *DLG5*, das erstmals 2004 als krankheitsrelevantes Gen für M. Crohn beschrieben wurde (Stoll et al. 2004).

Um die Rolle von *DLG5* in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und den molekularen Mechanismus von *DLG5* genauer zu betrachten, wurde mithilfe eines *in vivo* Mausmodells und *in vitro* Zellkulturexperimenten die Bedeutung dieses Gens untersucht.

4.1 Die Funktion von *Dlg5* im konditionale Knockout Modell der Maus

4.1.1 Die Deletion von *Dlg5* in den Darmepithelzellen der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse führt zu keinen Unterschieden in der basalen Phänotypisierung im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen

Bei den *Dlg5^{AIEC}* Mäusen, sogenannten konditionalen Knockout Mäusen, liegt eine Deletion von *Dlg5* in den intestinalen Epithelzellen vor. Konstitutive Knockout Mäuse (*Dlg5^{-/-}* Mäuse) hingegen weisen einen Verlust von *Dlg5* im gesamten Körpergewebe auf.

Nechiporuk et al. konnten zeigen, dass diese *Dlg5^{-/-}* Mäuse, bei denen also eine komplette Deletion von *Dlg5* vorliegt, einen pathologischen Phänotyp entwickeln. Hier zeigten sich bereits im äußeren Erscheinungsbild der Maus gravierende Unterschiede zu der Kontrollgruppe: die *Dlg5^{-/-}* Mäuse wiesen, bedingt durch einen Hydrozephalus, eine kuppelförmige Kopfform sowie ein atypisches Gangbild auf; außerdem lagen Nierenzysten und eine Wachstumsretardierung vor (Nechiporuk et al. 2007). Auffälligkeiten des Darmgewebes wurden nicht beschrieben. Als ursächlich für die genannten Veränderungen wurden Störungen der Zellpolarität und der Adhäsionsverbindungen (*adherens junctions*) beschrieben, die dazu führten, dass die röhrenförmige Anordnung der Epithelien nicht aufrechterhalten blieb. Auf molekularer Ebene sollen hierfür Störungen in der Freisetzung

und Stabilisierung des Cadherin-Catenin Adhäsionskomplexes verantwortlich sein (Nechiporuk et al. 2007).

Die aufgeführten Befunde von Nechiporuk et al. entsprachen auch eigenen Beobachtungen aus Experimenten mit konstitutiven *Dlg5*^{-/-} Mäusen, die am Institut für klinische Molekularbiologie durchgeführt worden waren (persönliche Mitteilung, P. Rosenstiel).

Aufgrund der oben aufgeführten Organdysfunktionen und der bereits damit verbundenen erhöhten, frühzeitigen Letalität, erschien die Durchführung einer DSS-induzierten Colitis in diesem Mausmodell nicht sinnvoll, sodass darauf verzichtet wurde. Um eine mögliche Dysfunktion von *Dlg5* auf das Darmgewebe der Mäuse zu begrenzen, ohne dass der Gesamtorganismus beeinträchtigt wird, erfolgte daher die Generierung einer konditionalen Knockout-Maus mit einem ausschließlich auf die intestinalen Epithelzellen begrenzten *Dlg5*-Knockout.

Dieses konditionale Knockout Maus-Modell wurde bereits in verschiedenen anderen Studien erfolgreich angewendet (Nenci et al. 2007, Gunther et al. 2011).

Im Gegensatz zu den konstitutiven Knockout Mäusen zeigten sich bei der basalen Phänotypisierung der *Dlg5*^{ΔIEC} Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen keine signifikanten Unterschiede.

Hierbei wurde im Einzelnen das äußere Erscheinungsbild der Mäuse, das Körpergewicht, sowie makroskopische und mikroskopische Untersuchungen des Darms miteinander verglichen.

Dabei zeigten sowohl die *Dlg5*^{ΔIEC} Mäuse als auch die Wildtyp Mäuse mit dem Alter eine reguläre Gewichtszunahme ohne relevante Gewichtsunterschiede zwischen beiden Mausgruppen. Daraus lässt sich schließen, dass der Verlust von *Dlg5* in den intestinalen Epithelzellen nicht zu einer Wachstumsretardierung der Mäuse führte, die beispielsweise durch Maldigestion oder Malabsorption ausgelöst werden könnte. Hierfür spricht auch der reguläre mikroskopische und makroskopische Befund des Darms bei den *Dlg5*^{ΔIEC} Mäusen, der mittels histologischer Untersuchungen erhoben wurde.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Verlust von *Dlg5* unter physiologischen Bedingungen zu keinen durch die genannten Untersuchungsverfahren nachweisbaren Veränderungen am Darmepithel geführt hat und wahrscheinlich erst ein entzündlicher Reiz den Verlust von *Dlg5* in Bezug auf seine Funktion für das Darmgewebe sichtbar machen würde.

4.1.2 Der konditionale Knockout von *Dlg5* führt zu einer höheren Empfindlichkeit der Mäuse im DSS-Entzündungsmodell

4.1.2.1 Triggerfaktoren können einen intestinalen Entzündungsprozess auslösen

Während in den Befunden zur basalen Phänotypisierung keine signifikanten Unterschiede zwischen den *Dlg5^{ΔIEC}* und Wildtyp Mäusen bestanden, zeigten sich dagegen im Rahmen der DSS-induzierten Colitis teilweise deutliche Unterschiede.

Um einen Effekt der *Dlg5*-Deletion nachweisen zu können, war demnach ein auslösender Faktor notwendig. Das in den Experimenten verwendete DSS als Auslöser der entzündlichen Prozesse im Darm der Mäuse, kann als ein so genannter Triggerfaktor gewertet werden. DSS wirkt toxisch auf die Darmepithelzellen und führt zu einer Störung der Integrität der Epithelbarriere, wodurch die Permeabilität der Darmschleimhaut erhöht wird und vermehrt größere Moleküle, wie das DSS, aber auch Antigene und Mikroorganismen, wie Bakterien, die Darmwand passieren und demzufolge eine überschießende entzündliche Reaktion auslösen können (Perse und Cerar 2012, Chassaing et al. 2014).

Solche Triggerfaktoren, spielen auch im klinischen Alltag in der Entstehung und Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine wichtige Rolle.

So konnten zum Beispiel Felder et al. im Jahr 2000 anhand einer Fall-Kontrollstudie nachweisen, dass die Einnahme von *nonsteroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDs) die Krankheitsaktivität sowohl bei M. Crohn auch als bei Colitis ulcerosa negativ beeinflusst (Felder et al. 2000). Des Weiteren konnte anhand einer Kohorten Studie gezeigt werden, dass die regelmäßige Einnahme von NSAIDs mit einer erhöhten Inzidenz an Colitis ulcerosa und Morbus Crohn assoziiert zu sein scheint (Ananthkrishnan et al. 2012).

Als weiterer Triggerfaktor neben der Einnahme von NSAID gilt auch eine frühe Exposition gegenüber Antibiotika in der Kindheit als Risikofaktor um an M. Crohn zu erkranken (Card et al. 2004, Hildebrand et al. 2008). Der Zusammenhang hierbei ist noch unklar. Erwiesen ist, dass die Antibiotika vorübergehend die Mikroflora des Darms verändern und somit einen potenziellen Risikofaktor für chronisch entzündliche Darmerkrankungen darstellen können (Card et al. 2004).

Insgesamt konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine Assoziation zwischen der Zusammensetzung der Darmflora und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen besteht. Ott et al. konnten in einer Studie an 57 Patienten mit einer aktiven chronisch entzündlichen Darmerkrankung im Vergleich zu einer Kontrollgruppe eine Reduktion der Diversität der intestinalen Mikroflora um 50% nachweisen. Als ursächlich hierfür zeigte sich

ein Verlust der in einer gesunden Darmflora vorkommenden anaerobe Bakterien, wie z.B. *Bacteroides species*, *Eubacterium species* und *Lactobacillus species* (Ott et al. 2004).

Andere Studien konnten zeigen, dass Patienten mit einem Morbus Crohn erhöhte Konzentrationen an *Escheria coli* und *Bacteroides species* aufweisen (Keighley et al. 1978, Swidsinski et al. 2002, Swidsinski et al. 2005). Eine erhöhte Konzentration an invasiven *Escheria coli* konnte in Ileumgewebe von Patienten mit Morbus Crohn nachgewiesen werden (Barnich und Darfeuille-Michaud 2007, Darfeuille-Michaud et al. 1998). Des Weiteren zeigten Studien, dass eine reduzierte Anzahl und geringere Diversität von *Firmicutes* im Magen von Patienten mit Morbus Crohn vorliegen (Gophna et al. 2006, Manichanh et al. 2006).

Auch in Mausmodellen nach Induktion einer Colitis durch DSS konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Couturier-Maillard et al. konnten zeigen, dass der Verlust von *NOD2* zu einer Instabilität in der Zusammensetzung der Darmflora und dadurch zu einem Risiko für die Entwicklung einer Colitis bzw. einer Colitis-assoziierten Karzinom-Genese in der Maus führt (Couturier-Maillard et al. 2013). Cathepsin K ist eine lysosomale Cystein Protease, die ebenfalls durch eine direkte bakterizide Wirkung gegenüber intestinalen Bakterien in diesem Zusammenhang von Bedeutung ist. In einem Mausmodell mit einem Knockout für Cathepsin K zeigte sich eine Veränderung der intestinalen Mikrobiota, die auf die bakterizide Wirkung der Protease zurückgeführt wurde und die mit einem erhöhten Entzündungsgeschehen einherging. Somit scheint Cathepsin K über die bakterizide Wirkung einen protektiven Effekt gegenüber einer intestinalen Entzündung zu haben (Sina et al. 2013). Diese beschriebenen Veränderungen in der Zusammensetzung der bakteriellen Darmflora könnten ebenfalls, wie oben genannt, als Triggerfaktor dienen, eine entzündliche Darmentzündung auszulösen.

4.1.2.2 Die *Dlg5^{AIEC}* Mäuse zeigen im klinischen Befund eine erhöhte Mortalitätsrate und eine stärkere Gewichtsabnahme

Im DSS-Experiment kam es bei den *Dlg5^{AIEC}* Mäusen zu einer höheren Mortalität im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen. Neben einer deutlichen Verschlechterung des Allgemeinzustandes war für die erhöhte Mortalität der starke Gewichtsverlust hauptsächlich, der bei einigen Mäusen zu einer Reduktion um 20% des Ausgangsgewichtes führte (Abbruchkriterium). Insgesamt lag die Mortalitätsrate der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse am Ende des Experimentes bei 47,67% und war somit fast doppelt so hoch wie die Mortalitätsrate der Wildtyp Mäuse (27,27%).

Bei beiden Mausgruppen kam es 2 Tage nach dem ersten Zyklus DSS zu einem leichten Abfall des Körpergewichtes unterhalb des Ausgangsgewichtes (Wildtyp Mäuse $99,56 \pm 3,03\%$, *Dlg5^{AIEC}* Mäuse $98,34 \pm 5,11 \%$, $p < 0,259$). Beim zweiten Zyklus DSS ließ sich bereits während der Gabe des DSS ein erneuter Körpergewichtsabfall in beiden Mausgruppen beobachten, wobei direkt nach Beendigung des 2. Zyklus DSS der Körpergewichtsverlust deutlich zunahm. Insgesamt lag in den ersten 3 Tagen nach Ende des zweiten DSS-Zyklus ein signifikant stärkerer Gewichtsabfall bei den *Dlg5^{AIEC}* Mäusen gegenüber den Wildtyp Mäusen vor. Im Verlauf des Experiments war der Gewichtsverlust bei den *Dlg5^{AIEC}* Mäusen zwar noch ausgeprägter gegenüber den Wildtyp Mäusen, jedoch nicht mehr signifikant. Somit scheint besonders der chronische Verlauf der Colitis durch den zweiten Zyklus einen starken Effekt auf den Gewichtsverlauf der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse zu haben.

Ein wichtiger Marker für den Schweregrad eines entzündlichen Geschehens im Darm ist die Veränderung des Körpergewichtes. Eine starke Gewichtsabnahme kann für eine schlechte Resorptionsfähigkeit des Darms sprechen und Ausdruck einer katabolen Stoffwechsellage des Organismus sein. Ebenfalls kann eine verminderte Nahrungsaufnahme ursächlich für eine Gewichtsabnahme sein.

Da sich nach der ersten DSS-Exposition über 5 Tage nur ein schwacher klinischer Effekt bei beiden Mausgruppen gezeigt hatte, wurde die zweite Exposition auf 6 Tage verlängert. Da es wie oben beschrieben bereits während des 2. DSS-Zyklus zu einem deutlichen Gewichtsverlust bei den Mäusen kam, ist zu vermuten, dass nicht die längere Expositionszeit mit DSS, sondern die wiederholte Gabe diesen Effekt bewirkt hat.

Ursächlich hierfür könnte die inkomplette Regeneration des Darms zwischen den beiden Zyklen sein. In vielen Mausmodellen konnte nämlich gezeigt werden, dass DSS einen toxischen Effekt auf Epithelzellen hat (Okayasu et al. 1990, Cooper et al. 1993, Yan et al. 2009, Kim et al. 2012, Perse und Cerar 2012), sodass anzunehmen ist, dass, bei erneuter Exposition von DSS und fehlender Epithelzellregeneration, die Auswirkungen deutlich stärker hier im Sinne eines stärkeren Gewichtsverlustes nachzuweisen sind.

Auch wenn bei beiden Mausgruppen dieser stärkerer Effekt nach der 2. Exposition nachzuweisen ist, war der Gewichtsverlust der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse signifikant höher als bei den Wildtyp Mäusen. Der Verlust von *Dlg5* in den Epithelzellen der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse scheint dafür ursächlich zu sein, dass der toxische Effekt von DSS auf die Epithelzellen größer und somit ihre Wiederverstandsfähigkeit geringer ist, ebenso wie die Regenerationsfähigkeit des intestinalen Epithels.

Der *Disease Activity Index* dient zur Beurteilung der Schwere der Colitis anhand klinischer Parameter. Der Index wurde an Tag 15 des Experimentes, also zum Ende des zweiten Zyklus der DSS-Exposition erhoben und zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mausgruppen. Prinzipiell hätte man aufgrund des Körpergewichtsverlaufes und der erhöhten Mortalitätsrate bei den *Dlg5^{AIEC}* Mäusen auch einen höheren DAI im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen als Ausdruck des schwereren Krankheitsverlaufes erwartet. Ursächlich hierfür könnte der Zeitpunkt der Datenerhebung (Tag 15) sein. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Mausgruppen von Gewichtsverlauf und der Mortalitätsrate traten erst einige Tage später auf, sodass der Zeitpunkt möglicherweise zu früh gewählt wurde.

4.1.2.3 Die *Dlg5* Deletion in den murinen Darmepithelzellen führt zu einem signifikant höheren intestinalen Entzündungsgeschehen bei den *Dlg5^{AIEC}* Mäusen

Während bei der basalen Phänotypisierung das Kolon beider Mausgruppen keine signifikanten Längenunterschiede aufwies, waren im DSS Experiment die Kolonlängen der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse signifikant kürzer als die der Wildtyp Mäuse und zwar durchschnittlich um 0,59 cm ($p < 0,041$).

Signifikante Unterschiede bestanden auch bei dem Gewicht des Zoekums. Bei den *Dlg5^{AIEC}* Mäusen lag das durchschnittliche Zoekumgewicht bei 0,47 g im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen (0,74 g, $p < 0,006$).

Dieses Phänomen wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen beobachtet, jedoch bleibt die Ursache dieser durch entzündliche Prozesse ausgelösten Darmverkürzung unklar (Okayasu et al. 1990, Siegmund et al. 2001a, Siegmund et al. 2001b, Sina et al. 2010).

Interessanterweise ist der Unterschied der erhobenen Befunde zwischen den beiden Mausgruppen beim Zoekum deutlich ausgeprägter als beim Kolon. Dieses lässt sich über die unterschiedliche Suszeptibilität der einzelnen Darmabschnitte von verschiedenen Mausstämmen auf das DSS erklären. Der für dieses Experiment verwendete Mausstamm (C57BL/6J) weist im distalen Kolon und Zoekum eine höhere Suszeptibilität gegenüber DSS als im proximalen und mittleren Kolon auf (Mahler et al. 1998, Perse und Cerar 2012).

Die Gewichtsbestimmung von Leber und Milz ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mausgruppen. Generell zeigte sich aber in beiden Mausgruppen nach Gabe von DSS ein geringes Milzgewicht im Vergleich zu unbehandelten Mäusen. Ursächlich hierfür könnte ein systemischer Effekt von DSS sein. Hinweise hierfür geben andere DSS-

induzierte Colitis Modelle in der Maus: Cooper et al. konnten eine Anreicherung von DSS in der Milz nachweisen (Cooper et al. 1993). Ebenfalls zeigte sich eine Aufnahme von DSS in den Kupferzellen der Leber (Kitajima et al. 1999).

Des Weiteren werden in der Literatur Veränderungen im Milzgewicht, hier aber eine Gewichtszunahme im Sinne einer Splenomegalie, als Zeichen einer systemischen Entzündungsreaktion beschrieben (McComb et al. 1999, Siegmund et al. 2001b).

Eigene Beobachtungen deuten darauf hin, dass es unter DSS zunächst zu einer Milzvergrößerung und danach, durch weitere Exposition, zur starken Milzverkleinerung kommt. Demnach zeigt der Gewichtsverlust der Milz in diesem Experiment an, dass bereits ein starker systemischer toxischer Effekt von DSS vorliegt. Dies wiederum könnte auch den schlechten Allgemeinzustand der Tiere generell erklären.

In der histologischen Beurteilung des Darmgewebes zeigte sich bei den *Dlg5^{AIEC}* Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen eine deutlich ausgeprägtere Entzündungsreaktion mit signifikantem Unterschied des histologischen Scorings ($p < 0,002$). Somit kann die bereits anhand der klinisch/makroskopischen Befunde angestellte Vermutung eines verstärkten Entzündungsgeschehens bei den *Dlg5^{AIEC}* Mäusen auf mikroskopisch/histologischer Ebene bestätigt werden.

Bei der isolierten Betrachtung der Epithelschädigung wurde im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen bei den *Dlg5^{AIEC}* Mäusen ebenfalls ein signifikant höhere Punktzahl erreicht ($p < 0,025$ bzw. $p < 0,03$). Ursächlich hierfür könnte z.B. sein, dass der Verlust von *Dlg5* in den intestinalen Epithelzellen der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse eine heilende Zellproliferation nach der DSS-induzierten Schädigung im Sinne eines Regenerationsdefektes verhindert. Zu dieser Hypothese würde auch der oben genannte klinische Befund (stärkerer Gewichtsverlust nach wiederholter DSS-Exposition) passen.

Die durchgeführte quantitative Bestimmung bzw. die Untersuchung der Genexpression der Zytokine (Il-1 β , Il-6, KC, Il-10, TNF- α , IFN- γ und MIP-1 α) im Kolongewebe erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Mausgruppen. Demnach scheint die Deletion von *Dlg5* im Darmepithel der Mäuse zumindest keinen starken Einfluss auf die Fähigkeit der angeborenen Immunreaktion der intestinalen Epithelzellen zu haben. Zusätzlich deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass bei der gerichteten Infiltration der Immunzellen zum Ort des Entzündungsgeschehens zwischen beiden Genotypen keine Unterschiede vorliegen. Diese Beobachtungen widersprechen jedoch den histologischen Befunden, bei denen sich eine deutlich erhöhte Entzündungszellinfiltration im Darmgewebe der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse nachweisen

ließ. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte damit zusammenhängen, dass Gesamtkolongewebe verwendet wurde und der molekulare Effekt der *Dlg5* Deletion in den intestinalen Epithelzellen dadurch maskiert wird, dass nicht ausschließlich intestinale Epithelzellen analysiert wurden. Offen bleibt aber weiterhin der Grund für die nicht messbare verstärkte Infiltration von Immunzellen (zelltypspezifische Zytokine oder Oberflächenmarker) in das Gesamtkolongewebe.

Bei fehlender Signifikanz konnte aber bei einigen Zytokinen im Serum der *Dlg5^{ΔIEC}* Mäuse eine im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen leicht höhere Konzentration bzw. im Zoekum eine leicht erhöhte Genexpression, wie z.B. bei *Il-1β*, *KC* und *MIP-1α* nachgewiesen werden. Beim *Il-6* war bei den *Dlg5^{ΔIEC}* Mäusen bei der Bestimmung der Genexpression die Konzentration im Zoekum und Kolon vermindert, in der quantitativen Bestimmung im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen im Serum jedoch erhöht.

Insgesamt waren dieses zwar keine signifikanten Ergebnisse; sie unterstützen aber prinzipiell die oben genannten Befunde, die für ein erhöhtes Entzündungsgeschehen bei den *Dlg5^{ΔIEC}* Mäusen sprechen.

Zusammenfassend kann man aus den erhobenen Befunden schließen, dass das Fehlen von *Dlg5* klinisch zu einem schwereren Krankheitsverlauf bei den Mäusen führt. Dieses konnte anhand der erhöhten Mortalitätsrate, dem stärkeren Gewichtsverlust, der Darmverkürzung sowie anhand des histologischen Scores gezeigt werden. Im Weiteren werden mögliche Ursachen hierfür diskutiert.

4.2 Mögliche Bedeutung des Gens *DLG5* für die Integrität der Darmwandbarriere

Unter der Annahme, dass der Verlust von *Dlg5* in den intestinalen Epithelzellen zu einer erhöhten Krankheitsaktivität führt, stellt sich die Frage, welche Funktion *Dlg5* in diesem Zusammenhang einnimmt.

Für die Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielt die Integrität der Darmwandbarriere eine bedeutende Rolle (Schreiber et al. 2005, Xavier und Podolsky 2007). Viele einzelne Komponenten tragen gemeinsam dazu bei, dass eine solche Barriere aufrechterhalten wird (Schreiber et al. 2005).

Andererseits können Störungen einzelner Komponenten dazu führen, dass die Integrität der Barriere gestört ist und in der Folge eine erhöhte Krankheitssuszeptibilität vorliegt (Schreiber et al. 2005).

So weisen auch viele der Gene (*NOD2*, *ATG16L1*, *IL-23R*), die bisher im Zusammenhang mit entzündlichen Darmkrankheiten identifiziert wurden, in die Richtung einer Barriestörung als hauptursächlichem Faktor (Schreiber et al. 2005).

DLG5 ist ein evolutionär konserviertes Gen, das zur Familie der Membran-assoziierten Guanylatkinasen (MAGUK) gehört (Nechiporuk et al. 2007). Varianten im *DLG5* Gen können mit dem Risiko assoziiert werden, eine chronisch entzündliche Darmerkrankung zu entwickeln (Stoll et al. 2004).

Wie in der Einleitung bereits erläutert, hat das Epithel als Bestandteil der Darmwandbarriere eine besondere Bedeutung (Schreiber et al. 2005). Die Epithelzellen besitzen zum einen eine mechanische Funktion, gleichzeitig sind sie aber auch aktiv an der Immunantwort beteiligt, indem sie beispielsweise eindringende Pathogene bekämpfen (Gewirtz 2003, Jobin 2003).

Zur Aufrechterhaltung der Epithelzellintegrität tragen verschiedene Mechanismen bei. Dazu zählen unter anderem die Adhäsionskontakte, die aus dem Transmembranprotein Cadherin und verschiedenen Plaque-Proteinen, wie z.B. Catenin und Vinculin aufgebaut sind und den Zell-Zell-Kontakt ermöglichen. Sie dienen u.a. der Zell-Zell-Erkennung zur Bildung und Erhaltung geordneter Zellverbände (Lüllmann-Rauch 2003). Daneben besitzt auch die Epithelzellproliferation und –regeneration sowie die funktionelle Homöostase des Darms (Balance zwischen Proliferation und Zelltod) eine große Bedeutung für die Epithelzellintegrität.

Nechiporuk et al. zeigten anhand eines *Dlg5*^{-/-} Knockout Modells, dass *Dlg5* sowohl für die Aufrechterhaltung der Adhäsionsverbindungen (*adherens junctions*) und der Epithelzellpolarität im Gehirn und Nierengewebe notwendig ist als auch auf molekularer Ebene für die Freisetzung und Stabilisierung des Cadherin-Catenin Adhäsionskomplexes (Nechiporuk et al. 2007). Außerdem wurde *DLG5* in einer Studie von Wakabayashi et al. als Bindungspartner des Vinexin-Vinculin-Komplexes und von β -Catenin an den Zell-Zell Kontaktstellen identifiziert (Wakabayashi et al. 2003). Vinexin ist ein fokales Adhäsionsprotein, das an Vinculin bindet (Kioka et al. 1999).

Die Bedeutung von *DLG5* für die Zell-Zell-Kontakte und die damit verbundene strukturelle Funktion in der Aufrechterhaltung der Epithelzellintegrität konnte in den Studien an Nieren-

und Hirngewebe gezeigt werden. Entsprechende Untersuchungen am Darmgewebe wurden in den genannten Studien jedoch nicht beschrieben.

Präliminär Untersuchungen dazu am Institut für klinische Molekularbiologie gaben keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Cadherin und Dlg5 in Darmgewebe (persönliche Mitteilung, P. Rosentiel).

Anhand der eigenen Ergebnisse scheint für das Darmgewebe die Epithelzellproliferation bzw. -regeneration und in diesem Zusammenhang *Dlg5* für die Aufrechterhaltung einer intakten Darmwandbarriere von großer Bedeutung zu sein. Hierfür spricht die in dieser Arbeit detektierte erhöhte Schädigung des Epithels nach chronisch induzierter Darmentzündung durch DSS sowie die erhöhte Rate an apoptotischen Zellen im Dünndarm der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse, gemessen mithilfe von TUNEL-Färbungen. Außerdem ist in der Regenerationsphase des ersten DSS-Zyklus eine verminderte Erholung der *Dlg5^{AIEC}* Mäuse, gemessen an der schlechten Gewichtszunahme, zu erkennen.

Es stellt sich die Frage, welche Funktion Dlg5 in diesem Zusammenhang einnimmt.

Für die Proliferation und Regeneration spielt, wie bereits oben erwähnt, der MAP-Kinase Signalweg eine zentrale Rolle, indem er die elementaren Funktionen wie Proliferation und Differenzierung steuert. (Müller-Esterl 2004).

In Experimenten mit HeLa Zellen konnte ein Zusammenhang zwischen ERK, einem wichtigen Bestandteil des MAP-Kinase Signalwegs, und *DLG5* gezeigt werden. Nach Deletion von *DLG5* mittels siRNA konnte in den Zellen eine erhöhte Phosphorylierung von ERK nachgewiesen werden.

Smolen et al. konnten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen *DLG5* und ERK nachweisen. In einer Studie zur Regulation der Zellmigration zeigte sich bei Mammakarzinom-Zellen mit einer Herunterregulation von *DLG5* (durch siRNA) eine deutlich erhöhte Phosphorylierung und somit Aktivierung von ERK1/2 (Smolen et al. 2010).

Ogleich ERK am besten bekannt ist für seine Funktion in der Aktivierung und Proliferationsinduktion, konnte in einigen Studien wiederum nachgewiesen werden, dass eine anhaltende Aktivität des MAP-Signalweges eine Seneszenz bzw. Wachstumsstopp in Zellen wie Fibroblasten, T-Zellen oder Hepatozyten auslösen kann (Serrano et al. 1997, Sewing et al. 1997, Tombes et al. 1998, Guegan et al. 2014).

Somit wäre eine mögliche Hypothese, dass es durch den *DLG5* Knockout zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERK und in der Folge zu einem Wachstumsarrest in den intestinalen Epithelzellen kommt. Folglich kommt es zur Störung der Epithelzellintegrität und nachfolgend zur verstärkten Entzündung u.a. aufgrund des Eindringens von Bakterien.

Alternativ wäre denkbar, dass es bei bereits erhöhtem Level an phosphoryliertem/aktiviertem ERK bei einer folgenden Schädigung zu keiner weiteren Steigerung der Aktivierung von ERK kommen kann und somit die notwendige Zellproliferaton/-regeneration ausbliebe.

Um diese Epithelzellregeneration genauer beurteilen zu können, hätten entsprechende Befunde einige Tage nach dem 2. Zyklus DSS, also während der Regenerationsphase, erhoben werden müssen. Dieses war aufgrund des schlechten Gesundheitszustandes der Mäuse und des damit verbundenen frühzeitigen Versuchsabbruchs nicht möglich. Zu vermuten ist, dass die *Dlg5^{ΔIEC}* Mäuse hier eine schlechtere Prognose gezeigt hätten, wie die bereits erwähnte verringerte Gewichtszunahme bei den *Dlg5^{ΔIEC}* Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen in der kurze Regenerationsphase nach dem 1. Zyklus DSS vermuten lässt.

Nach Abschluss der ersten Versuchsreihe soll daher nun ein zweites Experiment geplant werden, bei dem nur ein Zyklus DSS verabreicht wird und im Anschluss entsprechende Befunde in den Tagen der Regenerationsphase erhoben werden sollen. Diese Ergebnisse könnten eine genauere Beurteilung über die zellulären Prozesse (Regeneration und Proliferation) ermöglichen, die nach Setzen eines Entzündungsreizes in der Epithelzelle ablaufen.

4.3 Ausblick

In der Pathophysiologie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen geht man sowohl von einer multifaktoriellen als auch von einer polygenetischen Genese aus.

Genetische Variationen im *DLG5* Gen führen zu einer erhöhten Suszeptibilität des Menschen, an einer CED zu erkranken (Stoll et al. 2004). Die genetischen Variationen im Sinne eines genetischen Polymorphismus können sowohl zu einem kompletten oder eingeschränkten Funktionsverlust des Gens als auch zu einem Funktionszuwachs führen oder prinzipiell aber auch ohne Effekt bleiben. Erst im Zusammenspiel mit anderen genetischen Faktoren bzw. Umweltfaktoren kann es zu einer Manifestation der Erkrankung kommen.

Auch wenn daher *DLG5* nur ein kleiner Faktor in einem großen Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren in der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu sein scheint, ist die genaue Kenntnis der pathophysiologischen Mechanismen jedes einzelnen Faktors entscheidend in Hinblick auf die dadurch immer spezifischer werdenden Therapien.

Anhand der in dieser Arbeit aufgeführten Befunde und den sich daraus ergebenden Überlegungen, in wie fern die Funktion von *DLG5* mit der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zusammenhängen könnte, dient ausschließlich ein Maus-Modell als Grundlage dieser Überlegung. In wie weit dieses nun auf den Menschen und das Erkrankungsbild des M. Crohn übertragbar ist, bleibt offen.

Auch in diesem Modell, wie bei anderen CED Suszeptibilitätsgenen, wie z.B. *NOD2* (Amendola et al. 2014), *ATG16L1* (Adolph et al. 2013) und *Cathepsin K* (Sina et al. 2013), konnte bei den Mäusen kein spontaner Phänotyp beschrieben werden. Dieses könnte zum einen in der Physiologie der Maus begründet sein, zum anderen könnte dieses aber auch auf den Einfluss anderer (u.a. genetischer) Faktoren schließen lassen.

Im Hinblick auf die bisher durchgeführten Experimente und den daraus resultierenden Ergebnissen ergeben sich neue Aspekte und Überlegungsansätze für weitere Experimente und Versuchsverfahren. Nach Abschluss der ersten Versuchsreihe ist daher nun ein zweites Experiment mit der Induktion einer akuten Colitis geplant, um speziell die zellulären Prozesse der Regeneration und Proliferation, die nach Setzen eines Entzündungsreizes in der Epithelzelle ablaufen, genauer untersuchen zu können. Auch auf molekularbiologischer Ebene sollten die Prozesse der Proliferation sowie auch der Seneszenz z.B. mit siRNA gegen *DLG5* behandelten HeLa Zellen untersucht werden; insbesondere hierbei interessant ist die Bedeutung des ERK-Signalweges im Zusammenhang mit einem *DLG5* Knockout. Durch Immunpräzipitation oder *yeast-two-hybrid* Verfahren sollte nach Interaktionspartnern von *DLG5* gesucht werden, um das oder die Bindeglied/er zwischen *DLG5* und ERK aufdecken zu können. Zusätzlich könnten *in vitro* Experimente durchgeführt werden, die Aufschluss über die Auswirkung eines *DLG5* Knockouts auf die Zell-Zell-Kontakte geben könnten (z.B. mit siRNA gegen *DLG5* behandelten Caco2 Zellen). Ferner sollte der Befund des erhöhten Zelltods in den *Dlg5^{ΔIEC}* Mäusen nachgegangen und geklärt werden, ob *DLG5* direkt Wege des Zelltods (wie Apoptose) beeinflusst. Dies alles könnte letztendlich dazu dienen, neue Erkenntnisse in Bezug auf dessen Funktion insbesondere in Hinblick auf die Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu erlangen, sodass gezielte therapeutische Möglichkeiten geschaffen werden.

5 Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen, wie M. Crohn und Colitis ulcerosa, deren Ätiologie bis zum heutigen Zeitpunkt nicht letztendlich geklärt ist, sind charakterisiert durch chronisch-rezidivierende Entzündungen des Gastrointestinaltrakts. In der Pathogenese spielt eine Barrierestörung der Darmwand vor dem Hintergrund einer polygenetischen Suszeptibilität eine wichtige Rolle. Störungen der Barrierefunktion führen dazu, dass Bakterien die Darmwand passieren und intestinale Entzündungen auslösen können.

Verschiedene krankheitsrelevante Gene konnten bislang identifiziert werden, darunter auch *DLG5*, mit dessen Funktion sich die vorliegende Arbeit befasst.

Hierfür wurde mithilfe eines konditionalen *Dlg5* Knockout-Modells das Gen *Dlg5* in den intestinalen Epithelzellen von Mäusen selektiv deletiert. Um die Auswirkungen dieses Knockouts während eines entzündlichen Geschehens im Darm zu untersuchen, wurde mittels DSS eine Colitis induziert und die Befunde mit denen von Wildtyp Mäusen verglichen.

Die Befunde, die im Rahmen der DSS ausgelösten Colitis, erbrachten teilweise deutliche Unterschiede zwischen den *Dlg5^{ΔIEC}* und Wildtyp Mäusen: Die *Dlg5^{ΔIEC}* Mäuse zeigten eine erhöhte Letalitätsrate und einen stärkeren Gewichtsverlust, einen erhöhten histologischen Score, eine stärkere Epithelschädigung und eine erhöhte Apoptoserate der Epithelzellen. Hieraus ist zu schließen, dass der Verlust von *Dlg5* in den Knockout Mäusen ein stärkeres Entzündungsgeschehen auslöst, das mit einem schwereren Krankheitsverlauf und einer erhöhten Letalität einhergeht.

Ursachen hierfür könnten in einer Störung der Darmwandbarriere, insbesondere in der Funktion des Epithels liegen. Die wichtige Funktion von *DLG5* in der Aufrechterhaltung der Epithelzellintegrität konnte in anderen Studien bereits demonstriert werden, u.a. in seiner Funktion für die Zell-Zell-Kontakte in Nieren- und Hirngewebe. Anhand der erhobenen Befunde scheinen Veränderungen der Epithelzellproliferation und -regeneration des Darmepithels, ein weiterer Aspekt zu sein, der von großer Bedeutung für die Epithelzellintegrität ist. Hinweise auf eine Störung dieser Zellabläufe geben eine verstärkte Epithelschädigung sowie eine erhöhte Rate an apoptotischen Zellen im Dünndarm der *Dlg5^{ΔIEC}* Mäuse. Welche Funktion *DLG5* in diesen Zellabläufe einnimmt ist jedoch noch unklar.

In dieser Arbeit konnte auf molekularer Ebene durch *in vitro* Experimente in HeLa Zellen eine Verbindung zwischen dem Knockout von *Dlg5* und einer erhöhten Aktivierung von ERK, einem Bestandteil des MAP-Kinase Signalwegs, detektiert werden.

Ob für eine verminderte Proliferation und Regeneration ein durch die anhaltende Aktivität von ERK ausgelöster Wachstumsstop ursächlich ist, wie dies in einigen Studien gezeigt werden konnte, oder ob es, bei bereits erhöhtem Level an phosphoryliertem/aktiviertem ERK zu keiner weiteren Steigerung der ERK-Aktivität bei einer folgenden Schädigung kommen kann und somit die notwendige Zellproliferation/-regeneration ausbliebe, sind hypothetische Erklärungsmodelle, die es zu untersuchen gilt.

6 Literaturverzeichnis

- ABREU, M. T., VORA, P., FAURE, E., THOMAS, L. S., ARNOLD, E. T. & ARDITI, M. 2001. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*, 167, 1609-16.
- ADACHI, M., KUROTANI, R., MORIMURA, K., SHAH, Y., SANFORD, M., MADISON, B. B., GUMUCIO, D. L., MARIN, H. E., PETERS, J. M., YOUNG, H. A. & GONZALEZ, F. J. 2006. Peroxisome proliferator activated receptor gamma in colonic epithelial cells protects against experimental inflammatory bowel disease. *Gut*, 55, 1104-13.
- ADOLPH, T. E., TOMCZAK, M. F., NIEDERREITER, L., KO, H. J., BOCK, J., MARTINEZ-NAVES, E., GLICKMAN, J. N., TSCHURTSCHENTHALER, M., HARTWIG, J., HOSOMI, S., FLAK, M. B., CUSICK, J. L., KOHNO, K., IWAWAKI, T., BILLMANN-BORN, S., RAINE, T., BHARTI, R., LUCIUS, R., KWEON, M. N., MARCINIAK, S. J., CHOI, A., HAGEN, S. J., SCHREIBER, S., ROSENSTIEL, P., KASER, A. & BLUMBERG, R. S. 2013. Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature*, 503, 272-6.
- AGGARWAL, S., GHILARDI, N., XIE, M. H., DE SAUVAGE, F. J. & GURNEY, A. L. 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*, 278, 1910-4.
- AMENDOLA, A., BUTERA, A., SANCHEZ, M., STROBER, W. & BOIRIVANT, M. 2014. Nod2 deficiency is associated with an increased mucosal immunoregulatory response to commensal microorganisms. *Mucosal Immunol*, 7, 391-404.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N., HIGUCHI, L. M., HUANG, E. S., KHALILI, H., RICHTER, J. M., FUCHS, C. S. & CHAN, A. T. 2012. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann Intern Med*, 156, 350-9.
- BARNICH, N. & DARFEUILLE-MICHAUD, A. 2007. Adherent-invasive Escherichia coli and Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 23, 16-20.
- BÖCKER, W. D., H.; HEITZ, PH U 2004. *Repetitorium Pathologies*, München, Urban & Fischer.
- CARD, T., LOGAN, R. F., RODRIGUES, L. C. & WHEELER, J. G. 2004. Antibiotic use and the development of Crohn's disease. *Gut*, 53, 246-50.
- CARIO, E., ROSENBERG, I. M., BRANDWEIN, S. L., BECK, P. L., REINECKER, H. C. & PODOLSKY, D. K. 2000. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol*, 164, 966-72.
- CHASSAING, B., AITKEN, J. D., MALLESHAPPA, M. & VIJAY-KUMAR, M. 2014. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*, 104, Unit 15 25.
- CHEN, Y., THAI, P., ZHAO, Y. H., HO, Y. S., DESOUZA, M. M. & WU, R. 2003. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J Biol Chem*, 278, 17036-43.
- COOPER, H. S., MURTHY, S. N., SHAH, R. S. & SEDERGRAN, D. J. 1993. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*, 69, 238-49.
- COUTURIER-MAILLARD, A., SECHER, T., REHMAN, A., NORMAND, S., DE ARCANGELIS, A., HAESLER, R., HUOT, L., GRANDJEAN, T., BRESSENOT, A., DELANOYE-CRESPIN, A., GAILLOT, O., SCHREIBER, S., LEMOINE, Y.,

- RYFFEL, B., HOT, D., NUNEZ, G., CHEN, G., ROSENSTIEL, P. & CHAMAILLARD, M. 2013. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J Clin Invest*, 123, 700-11.
- DARFEUILLE-MICHAUD, A., NEUT, C., BARNICH, N., LEDERMAN, E., DI MARTINO, P., DESREUMAUX, P., GAMBIEZ, L., JOLY, B., CORTOT, A. & COLOMBEL, J. F. 1998. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 115, 1405-13.
- DUERR, R. H., TAYLOR, K. D., BRANT, S. R., RIOUX, J. D., SILVERBERG, M. S., DALY, M. J., STEINHART, A. H., ABRAHAM, C., REGUEIRO, M., GRIFFITHS, A., DASSOPOULOS, T., BITTON, A., YANG, H., TARGAN, S., DATTA, L. W., KISTNER, E. O., SCHUMM, L. P., LEE, A. T., GREGERSEN, P. K., BARMADA, M. M., ROTTER, J. I., NICOLAE, D. L. & CHO, J. H. 2006. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*, 314, 1461-3.
- ELBASHIR, S. M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K. & TUSCHL, T. 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494-8.
- ELBASHIR, S. M., MARTINEZ, J., PATKANIOWSKA, A., LENDECKEL, W. & TUSCHL, T. 2001b. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J*, 20, 6877-88.
- FELDER, J. B., KORELITZ, B. I., RAJAPAKSE, R., SCHWARZ, S., HORATAGIS, A. P. & GLEIM, G. 2000. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol*, 95, 1949-54.
- FINA, D., SARRA, M., FANTINI, M. C., RIZZO, A., CARUSO, R., CAPRIOLI, F., STOLFI, C., CARDOLINI, I., DOTTORI, M., BOIRIVANT, M., PALLONE, F., MACDONALD, T. T. & MONTELEONE, G. 2008. Regulation of gut inflammation and th17 cell response by interleukin-21. *Gastroenterology*, 134, 1038-48.
- GASSLER, N., ROHR, C., SCHNEIDER, A., KARTENBECK, J., BACH, A., OBERMULLER, N., OTTO, H. F. & AUTSCHBACH, F. 2001. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281, G216-28.
- GEWIRTZ, A. T. 2003. Intestinal epithelial toll-like receptors: to protect. And serve? *Curr Pharm Des*, 9, 1-5.
- GIRARDIN, S. E., BONECA, I. G., VIALA, J., CHAMAILLARD, M., LABIGNE, A., THOMAS, G., PHILPOTT, D. J. & SANSONETTI, P. J. 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*, 278, 8869-72.
- GOPHNA, U., SOMMERFELD, K., GOPHNA, S., DOOLITTLE, W. F. & VELDHUYZEN VAN ZANTEN, S. J. 2006. Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol*, 44, 4136-41.
- GUEGAN, J. P., EZAN, F., GAILHOUSTE, L., LANGOUET, S. & BAFFET, G. 2014. MEK1/2 overactivation can promote growth arrest by mediating ERK1/2-dependent phosphorylation of p70S6K. *J Cell Physiol*, 229, 903-15.
- GUNTHER, C., MARTINI, E., WITTKOPF, N., AMANN, K., WEIGMANN, B., NEUMANN, H., WALDNER, M. J., HEDRICK, S. M., TENZER, S., NEURATH, M. F. & BECKER, C. 2011. Caspase-8 regulates TNF-alpha-induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature*, 477, 335-9.
- HAMPE, J., CUTHBERT, A., CROUCHER, P. J., MIRZA, M. M., MASCHERETTI, S., FISHER, S., FRENZEL, H., KING, K., HASSELMAYER, 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. 2001. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*, 357, 1925-8.
- HAMPE, J., FRANKE, A., ROSENSTIEL, P., TILL, A., TEUBER, M., HUSE, K., ALBRECHT, M., MAYR, G., DE LA VEGA, F. M., BRIGGS, J., GUNTHER, S., PRESCOTT, N. J., ONNIE, C. M., HASLER, R., SIPOS, B., FOLSCH, U. R., LENGAUER, T., PLATZER, M., MATHEW, C. G., KRAWCZAK, M. & SCHREIBER, S. 2007. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*, 39, 207-11.
- HAMPE, J., HEYMANN, K., KRAWCZAK, M. & SCHREIBER, S. 2003. Association of inflammatory bowel disease with indicators for childhood antigen and infection exposure. *Int J Colorectal Dis*, 18, 413-7.
- HEROLD, G. 2009. *Innere Medizin*, Köln, Gerd Herold.
- HILDEBRAND, H., MALMBORG, P., ASKLING, J., EKBOM, A. & MONTGOMERY, S. M. 2008. Early-life exposures associated with antibiotic use and risk of subsequent Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*, 43, 961-6.
- HIROTA, K., DUARTE, J. H., VELDHORN, M., HORNSBY, E., LI, Y., CUA, D. J., AHLFORS, H., WILHELM, C., TOLAINI, M., MENZEL, U., GAREFALAKI, A., POCOTNIK, A. J. & STOCKINGER, B. 2011. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol*, 12, 255-63.
- HISAMATSU, T., SUZUKI, M., REINECKER, H. C., NADEAU, W. J., MCCORMICK, B. A. & PODOLSKY, D. K. 2003. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 124, 993-1000.
- HORNEF, M. W., FRISAN, T., VANDEWALLE, A., NORMARK, S. & RICHTER-DAHLFORS, A. 2002. Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med*, 195, 559-70.
- HUGOT, J. P., CHAMAILLARD, M., ZOUALI, H., LESAGE, S., CEZARD, J. P., BELAICHE, J., ALMER, S., TYSK, C., O'MORAIN, C. A., GASSULL, M., BINDER, V., FINKEL, Y., CORTOT, A., MODIGLIANI, R., LAURENT-PUIG, P., GOWER-ROUSSEAU, C., MACRY, J., COLOMBEL, J. F., SAHBATOU, M. & THOMAS, G. 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411, 599-603.
- INOHARA, N., OGURA, Y., FONTALBA, A., GUTIERREZ, O., PONS, F., CRESPO, J., FUKASE, K., INAMURA, S., KUSUMOTO, S., HASHIMOTO, M., FOSTER, S. J., MORAN, A. P., FERNANDEZ-LUNA, J. L. & NUNEZ, G. 2003. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*, 278, 5509-12.
- JOBIN, C. 2003. Intestinal epithelial cells and innate immunity in the intestine: is CARD15/Nod2 another player? *Gastroenterology*, 124, 1145-9.
- KEIGHLEY, M. R., ARABI, Y., DIMOCK, F., BURDON, D. W., ALLAN, R. N. & ALEXANDER-WILLIAMS, J. 1978. Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora. *Gut*, 19, 1099-104.
- KHADER, S. A., PEARL, J. E., SAKAMOTO, K., GILMARTIN, L., BELL, G. K., JELLEY-GIBBS, D. M., GHILARDI, N., DESAUVAGE, F. & COOPER, A. M. 2005. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J Immunol*, 175, 788-95.

- KIM, J. J., SHAJIB, M. S., MANOCHA, M. M. & KHAN, W. I. 2012. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J Vis Exp*.
- KINUGASA, T., SAKAGUCHI, T., GU, X. & REINECKER, H. C. 2000. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology*, 118, 1001-11.
- KIOKA, N., SAKATA, S., KAWAUCHI, T., AMACHI, T., AKIYAMA, S. K., OKAZAKI, K., YAEN, C., YAMADA, K. M. & AOTA, S. 1999. Vinexin: a novel vinculin-binding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization. *J Cell Biol*, 144, 59-69.
- KITAJIMA, S., TAKUMA, S. & MORIMOTO, M. 1999. Tissue distribution of dextran sulfate sodium (DSS) in the acute phase of murine DSS-induced colitis. *J Vet Med Sci*, 61, 67-70.
- KOBAYASHI, K. S., CHAMAILLARD, M., OGURA, Y., HENEGARIU, O., INOHARA, N., NUNEZ, G. & FLAVELL, R. A. 2005. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, 307, 731-4.
- KOUTROUBAKIS, I., MANOUSOS, O. N., MEUWISSEN, S. G. & PENA, A. S. 1996. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology*, 43, 381-93.
- KUCHARZIK, T., HUDSON, J. T., 3RD, LUGERING, A., ABBAS, J. A., BETTINI, M., LAKE, J. G., EVANS, M. E., ZIEGLER, T. R., MERLIN, D., MADARA, J. L. & WILLIAMS, I. R. 2005. Acute induction of human IL-8 production by intestinal epithelium triggers neutrophil infiltration without mucosal injury. *Gut*, 54, 1565-72.
- KUCHARZIK, T., WALSH, S. V., CHEN, J., PARKOS, C. A. & NUSRAT, A. 2001. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol*, 159, 2001-9.
- KULLBERG, M. C., JANKOVIC, D., FENG, C. G., HUE, S., GORELICK, P. L., MCKENZIE, B. S., CUA, D. J., POWRIE, F., CHEEVER, A. W., MALOY, K. J. & SHER, A. 2006. IL-23 plays a key role in *Helicobacter hepaticus*-induced T cell-dependent colitis. *J Exp Med*, 203, 2485-94.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LANGRISH, C. L., CHEN, Y., BLUMENSCHNEIN, W. M., MATTSON, J., BASHAM, B., SEDGWICK, J. D., MCCLANAHAN, T., KASTELEIN, R. A. & CUA, D. J. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 201, 233-40.
- LANGRISH, C. L., MCKENZIE, B. S., WILSON, N. J., DE WAAL MALEFYT, R., KASTELEIN, R. A. & CUA, D. J. 2004. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*, 202, 96-105.
- LAROU, H., INGERSOLL, S. A., LIU, H. C., BAKER, M. T., AYYADURAI, S., CHARANIA, M. A., LAROU, F., YAN, Y., SITARAMAN, S. V. & MERLIN, D. 2012. Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. *PLoS One*, 7, e32084.
- LAUKOETTER, M. G., NAVA, P., LEE, W. Y., SEVERSON, E. A., CAPALDO, C. T., BABBIN, B. A., WILLIAMS, I. R., KOVAL, M., PEATMAN, E., CAMPBELL, J. A., DERMODY, T. S., NUSRAT, A. & PARKOS, C. A. 2007. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med*, 204, 3067-76.
- LEE, J., GIORDANO, S. & ZHANG, J. 2012. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J*, 441, 523-40.

- LEE, Y. K., TURNER, H., MAYNARD, C. L., OLIVER, J. R., CHEN, D., ELSON, C. O. & WEAVER, C. T. 2009. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity*, 30, 92-107.
- LIPINSKI, S., GRABE, N., JACOBS, G., BILLMANN-BORN, S., TILL, A., HASLER, R., ADEN, K., PAULSEN, M., ARLT, A., KRAEMER, L., HAGEMANN, N., ERDMANN, K. S., SCHREIBER, S. & ROSENSTIEL, P. 2012. RNAi screening identifies mediators of NOD2 signaling: implications for spatial specificity of MDP recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 21426-31.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. 2003. *Histologie Verrstehen-Lernen-Nachschnagen*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- MAEDA, S., HSU, L. C., LIU, H., BANKSTON, L. A., IIMURA, M., KAGNOFF, M. F., ECKMANN, L. & KARIN, M. 2005. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science*, 307, 734-8.
- MAHLER, M., BRISTOL, I. J., LEITER, E. H., WORKMAN, A. E., BIRKENMEIER, E. H., ELSON, C. O. & SUNDBERG, J. P. 1998. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am J Physiol*, 274, G544-51.
- MANICHANH, C., RIGOTTIER-GOIS, L., BONNAUD, E., GLOUX, K., PELLETIER, E., FRANGEUL, L., NALIN, R., JARRIN, C., CHARDON, P., MARTEAU, P., ROCA, J. & DORE, J. 2006. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, 55, 205-11.
- MASHIMO, H., WU, D. C., PODOLSKY, D. K. & FISHMAN, M. C. 1996. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science*, 274, 262-5.
- MCCOMB, J., GOULD, T., CHLIPALA, E., SENNELO, G., FRAZIER, J., KIEFT, G., SEELY, J., EDWARDS, C. K., 3RD & BENDELE, A. 1999. Antiarthritic activity of soluble tumor necrosis factor receptor type I forms in adjuvant arthritis: correlation of plasma levels with efficacy. *J Rheumatol*, 26, 1347-51.
- MCGEACHY, M. J. & CUA, D. J. 2008. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*, 28, 445-53.
- MORRISON, P. J., BALLANTYNE, S. J. & KULLBERG, M. C. 2011. Interleukin-23 and T helper 17-type responses in intestinal inflammation: from cytokines to T-cell plasticity. *Immunology*, 133, 397-408.
- MÜLLER-ESTERL, W. 2004. *Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Spektrum Akademischer Verlag.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-50.
- NAKAMURA, H., SUDO, T., TSUIKI, H., MIYAKE, H., MORISAKI, T., SASAKI, J., MASUKO, N., KOCHI, M., USHIO, Y. & SAYA, H. 1998. Identification of a novel human homolog of the Drosophila dlG, P-dlg, specifically expressed in the gland tissues and interacting with p55. *FEBS Lett*, 433, 63-7.
- NECHIPORUK, T., FERNANDEZ, T. E. & VASIOUKHIN, V. 2007. Failure of epithelial tube maintenance causes hydrocephalus and renal cysts in Dlg5^{-/-} mice. *Dev Cell*, 13, 338-50.
- 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. 2007. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature*, 446, 557-61.
- NOURRY, C., GRANT, S. G. & BORG, J. P. 2003. PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE*, 2003, RE7.

- O'NEIL, D. A., PORTER, E. M., ELEWAUT, D., ANDERSON, G. M., ECKMANN, L., GANZ, T. & KAGNOFF, M. F. 1999. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol*, 163, 6718-24.
- OGAWA, A., ANDOH, A., ARAKI, Y., BAMBA, T. & FUJIYAMA, Y. 2004. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Immunol*, 110, 55-62.
- OGURA, Y., BONEN, D. K., INOHARA, N., NICOLAE, D. L., CHEN, F. F., RAMOS, R., BRITTON, H., MORAN, T., KARALIUSKAS, R., DUERR, R. H., ACHKAR, J. P., BRANT, S. R., BAYLESS, T. M., KIRSCHNER, B. S., HANAUER, S. B., NUNEZ, G. & CHO, J. H. 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411, 603-6.
- OKAYASU, I., HATAKEYAMA, S., YAMADA, M., OHKUSA, T., INAGAKI, Y. & NAKAYA, R. 1990. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98, 694-702.
- OTT, S. J., MUSFELDT, M., WENDEROTH, D. F., HAMPE, J., BRANT, O., FOLSCH, U. R., TIMMIS, K. N. & SCHREIBER, S. 2004. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, 53, 685-93.
- PARK, S. W., ZHEN, G., VERHAEGHE, C., NAKAGAMI, Y., NGUYENVU, L. T., BARCZAK, A. J., KILLEEN, N. & ERLE, D. J. 2009. The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 6950-5.
- PERSE, M. & CERAR, A. 2012. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 718617.
- PODOLSKY, D. K. 2002. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 347, 417-29.
- RENZ-POLSTER, H. K., S.; BRAUN, J. 2004. *Basislehrbuch Innere Medizin*, München, Urban & Fischer.
- ROGLER, G., BRAND, K., VOGL, D., PAGE, S., HOFMEISTER, R., ANDUS, T., KNUECHEL, R., BAEUERLE, P. A., SCHOLMERICH, J. & GROSS, V. 1998. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*, 115, 357-69.
- ROSENSTIEL, P., FANTINI, M., BRAUTIGAM, K., KUHBACHER, T., WAETZIG, G. H., SEEGERT, D. & SCHREIBER, S. 2003. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 124, 1001-9.
- SCHREIBER, S., ROSENSTIEL, P., ALBRECHT, M., HAMPE, J. & KRAWCZAK, M. 2005. Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat Rev Genet*, 6, 376-88.
- SERRANO, M., LIN, A. W., MCCURRACH, M. E., BEACH, D. & LOWE, S. W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88, 593-602.
- SEWING, A., WISEMAN, B., LLOYD, A. C. & LAND, H. 1997. High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*, 17, 5588-97.
- SIEGMUND, B., LEHR, H. A., FANTUZZI, G. & DINARELLO, C. A. 2001a. IL-1 beta - converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13249-54.
- SIEGMUND, B., RIEDER, F., ALBRICH, S., WOLF, K., BIDLINGMAIER, C., FIRESTEIN, G. S., BOYLE, D., LEHR, H. A., LOHER, F., HARTMANN, G., ENDRES, S. & EIGLER, A. 2001b. Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 296, 99-105.

- SINA, C., ARLT, A., GAVRILOVA, O., MIDTLING, E., KRUSE, M. L., MUERKOSTER, S. S., KUMAR, R., FOLSCH, U. R., SCHREIBER, S., ROSENSTIEL, P. & SCHAFER, H. 2010. Ablation of gly96/immediate early gene-X1 (gly96/iex-1) aggravates DSS-induced colitis in mice: role for gly96/iex-1 in the regulation of NF-kappaB. *Inflamm Bowel Dis*, 16, 320-31.
- SINA, C., GAVRILOVA, O., FORSTER, M., TILL, A., DERER, S., HILDEBRAND, F., RAABE, B., CHALARIS, A., SCHELLER, J., REHMANN, A., FRANKE, A., OTT, S., HASLER, R., NIKOLAUS, S., FOLSCH, U. R., ROSE-JOHN, S., JIANG, H. P., LI, J., SCHREIBER, S. & ROSENSTIEL, P. 2009. G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *J Immunol*, 183, 7514-22.
- SINA, C., LIPINSKI, S., GAVRILOVA, O., ADEN, K., REHMAN, A., TILL, A., RITTGER, A., PODSCHUN, R., MEYER-HOFFERT, U., HAESLER, R., MIDTLING, E., PUTSEP, K., MCGUCKIN, M. A., SCHREIBER, S., SAFTIG, P. & ROSENSTIEL, P. 2013. Extracellular cathepsin K exerts antimicrobial activity and is protective against chronic intestinal inflammation in mice. *Gut*, 62, 520-30.
- SMOLEN, G. A., ZHANG, J., ZUBROWSKI, M. J., EDELMAN, E. J., LUO, B., YU, M., NG, L. W., SCHERBER, C. M., SCHOTT, B. J., RAMASWAMY, S., IRIMIA, D., ROOT, D. E. & HABER, D. A. 2010. A genome-wide RNAi screen identifies multiple RSK-dependent regulators of cell migration. *Genes Dev*, 24, 2654-65.
- STENZEL, N., FETZER, C. P., HEUMANN, R. & ERDMANN, K. S. 2009. PDZ-domain-directed basolateral targeting of the peripheral membrane protein FRMPD2 in epithelial cells. *J Cell Sci*, 122, 3374-84.
- STOLL, M., CORNELIUSSEN, B., COSTELLO, C. M., WAETZIG, G. H., MELLGARD, B., KOCH, W. A., ROSENSTIEL, P., ALBRECHT, M., CROUCHER, P. J., SEEGERT, D., NIKOLAUS, S., HAMPE, J., LENGAUER, T., PIERROU, S., FOELSCH, U. R., MATHEW, C. G., LAGERSTROM-FERMER, M. & SCHREIBER, S. 2004. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet*, 36, 476-80.
- SUGIMOTO, K., OGAWA, A., MIZOGUCHI, E., SHIMOMURA, Y., ANDOH, A., BHAN, A. K., BLUMBERG, R. S., XAVIER, R. J. & MIZOGUCHI, A. 2008. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest*, 118, 534-44.
- SWIDSINSKI, A., LADHOFF, A., PERNTHALER, A., SWIDSINSKI, S., LOENING-BAUCKE, V., ORTNER, M., WEBER, J., HOFFMANN, U., SCHREIBER, S., DIETEL, M. & LOCHS, H. 2002. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 122, 44-54.
- SWIDSINSKI, A., WEBER, J., LOENING-BAUCKE, V., HALE, L. P. & LOCHS, H. 2005. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol*, 43, 3380-9.
- TOMBES, R. M., AUER, K. L., MIKKELSEN, R., VALERIE, K., WYMAN, M. P., MARSHALL, C. J., MCMAHON, M. & DENT, P. 1998. The mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade can either stimulate or inhibit DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes depending upon whether its activation is acute/phasic or chronic. *Biochem J*, 330 (Pt 3), 1451-60.
- VAN DER SLUIS, M., DE KONING, B. A., DE BRUIJN, A. C., VELCICH, A., MEIJERINK, J. P., VAN GOUDOEVER, J. B., BULLER, H. A., DEKKER, J., VAN SEUNINGEN, I., RENES, I. B. & EINERHAND, A. W. 2006. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*, 131, 117-29.

- WAKABAYASHI, M., ITO, T., MITSUSHIMA, M., AIZAWA, S., UEDA, K., AMACHI, T. & KIOKA, N. 2003. Interaction of Ipk-dlg/KIAA0583, a membrane-associated guanylate kinase family protein, with vinexin and beta-catenin at sites of cell-cell contact. *J Biol Chem*, 278, 21709-14.
- WEAVER, C. T., HATTON, R. D., MANGAN, P. R. & HARRINGTON, L. E. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 25, 821-52.
- WEHKAMP, J., HARDER, J., WEICHENTHAL, M., SCHWAB, M., SCHAFFELER, E., SCHLEE, M., HERRLINGER, K. R., STALLMACH, A., NOACK, F., FRITZ, P., SCHRODER, J. M., BEVINS, C. L., FELLERMANN, K. & STANGE, E. F. 2004. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*, 53, 1658-64.
- WEHKAMP, J., SALZMAN, N. H., PORTER, E., NUDING, S., WEICHENTHAL, M., PETRAS, R. E., SHEN, B., SCHAEFFELER, E., SCHWAB, M., LINZMEIER, R., FEATHERS, R. W., CHU, H., LIMA, H., JR., FELLERMANN, K., GANZ, T., STANGE, E. F. & BEVINS, C. L. 2005. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18129-34.
- XAVIER, R. J. & PODOLSKY, D. K. 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448, 427-34.
- YAN, Y., KOLACHALA, V., DALMASSO, G., NGUYEN, H., LAROUI, H., SITARAMAN, S. V. & MERLIN, D. 2009. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One*, 4, e6073.
- YANG, X. O., CHANG, S. H., PARK, H., NURIEVA, R., SHAH, B., ACERO, L., WANG, Y. H., SCHLUNS, K. S., BROADDUS, R. R., ZHU, Z. & DONG, C. 2008. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med*, 205, 1063-75.
- YEN, D., CHEUNG, J., SCHEERENS, H., POULET, F., MCCLANAHAN, T., MCKENZIE, B., KLEINSCHEK, M. A., OWYANG, A., MATTSON, J., BLUMENSCHNEIN, W., MURPHY, E., SATHE, M., CUA, D. J., KASTELEIN, R. A. & RENNICK, D. 2006. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*, 116, 1310-6.
- ZENEWICZ, L. A., YANCOPOULOS, G. D., VALENZUELA, D. M., MURPHY, A. J., STEVENS, S. & FLAVELL, R. A. 2008. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity*, 29, 947-57.
- ZHENG, W., ROSENSTIEL, P., HUSE, K., SINA, C., VALENTONYTE, R., MAH, N., ZEITLMANN, L., GROSSE, J., RUF, N., NURNBERG, P., COSTELLO, C. M., ONNIE, C., MATHEW, C., PLATZER, M., SCHREIBER, S. & HAMPE, J. 2006. Evaluation of AGR2 and AGR3 as candidate genes for inflammatory bowel disease. *Genes Immun*, 7, 11-8.

7 Anhang

7.1 Antikörper

Für den Westernblot wurden die Antikörper mit 5% MMP in TTBS verdünnt. Ms, rb, gt, rt bezeichnet die Spezies des Antikörpers: ms = *mouse* (Maus), rb = *rabbit* (Kaninchen), gt = *goat* (Ziege), rt = *rat* (Ratte). Die Prozentangabe (w/v) bezieht sich auf die Blocking-Substanz.

7.1.1 Primäre Antikörper

Tabelle 12: Verwendete primäre Antikörper mit Name des Herstellers

| Zielprotein | Bezeichnung | Spezies, Applikation, Verdünnung | Hersteller |
|-----------------|----------------------|----------------------------------|----------------|
| β -Actin | Anti- β -Actin | ms, WB 1:10000 (5%MMP) | Sigma-Aldrich |
| DLG5 | Anti-DLG5 C-19 | gt, WB 1:1000 (5% MMP) | Santa Cruz |
| p44/42 | Anti-p44/42 | rb, WB 1:1000 (5% MMP) | Cell Signaling |
| phosphor p44/42 | Anti-phospho-p44/42 | rb, WB 1:1000 (5% MMP) | Cell Signaling |
| Tubulin | Anti-Tubulin | ms, WB 1:1000 (5% MMP) | Zymed |

7.1.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 13: Verwendete sekundäre Antikörper mit Name des Herstellers

| Spezies | Bezeichnung | Verdünnung | Hersteller |
|---------|-------------|------------------|------------|
| Rabbit | Anti-Rabbit | 1:1000 (5 % MMP) | Amersham |
| Mouse | Anti-Mouse | 1:1000 (5 % MMP) | Amersham |
| Goat | Anti-Goat | 1:1000 (5 % MMP) | Amersham |

7.2 Chemikalien, Enzyme, Medien und Zusätze

Tabelle 14: Bezeichnung und Name des Herstellers verwendeter Chemikalien und Zusätze

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|--------------------------------|
| 6-Amino-Capronsäure | Merck, Darmstadt |
| Aceton | Merck, Darmstadt |
| Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30:0,8) | BioRad, München |
| Agarose | Eurogentec, Köln |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Merck, Darmstadt |
| Aqua Tex | Merck, Darmstadt |
| Bromphenolblau | Merck, Darmstadt |
| BSA-Lösung (10mg/ml) | NEB, Bad Schwalbach |
| Citratpuffer | Merck, Darmstadt |
| DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) | Sigma-Aldrich, München |
| DEPC | Sigma-Aldrich, München |
| DSS | MP Biomedicals, Santa Ana, USA |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich, München |
| DMEM | PAA Laboratories, Linz |
| dNTP Set (100 mM-Lösung) | Invitrogen, Karlsruhe |
| Edithiumbromid | Invitrogen, Karlsruhe |
| Eosin | Roth, Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Sigma, München |
| Fetales Kälberserum (FKS) | PAA Laboratories, Linz |
| Glycerol | Merck, Darmstadt |
| Hämalaun | Roth, Karlsruhe |
| HCl | Merck, Darmstadt |
| H ₂ O ₂ | Merck, Darmstadt |
| KCl | Merck, Darmstadt |
| KH ₂ PO ₄ | Merck, Darmstadt |
| Magermilchpulver (MMP) | BioRad, München |
| MEM with Earle's Salts | PAA Laboratories, Linz |
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, München |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| NaCl | Merck, Darmstadt |
| Na ₂ HPO ₄ | Merck, Darmstadt |
| Paraformaldehyd (PFA) | Merck, Darmstadt |
| 1x PBS | PAA Laboratories, Linz |
| Penicillin + Streptomycin | Biochrom, Berlin |
| Phosphatase Inhibitor Cocktail II | Sigma-Aldrich, München |

| | |
|---|-------------------------------------|
| Protease-Inhibitor-Cocktail | Sigma-Aldrich, München |
| Proteinkinase K | Qiagen, Hilden |
| RPMI-1640 Medium | PAA Laboratories, Linz |
| SDS | Calbiochem, Bad Soden |
| siPORT amine | Life Technologies, Darmstadt |
| SYBR® Safe DNA Gel Stain | Life Technologies, Darmstadt |
| TEMED | Sigma-Aldrich, München |
| TNF- α | Gibco, Life Technologies, Darmstadt |
| Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) | BioSource Europe, Nivelles, Belgien |
| Tris | Merck, Darmstadt |
| Trypan Blau | Sigma-Aldrich, München |
| Tween20 | Merck, Darmstadt |
| Wasserstoffperoxid (30% Lösung) | Sigma-Aldrich, München |
| Xylol | Merck, Darmstadt |

7.3 Puffer und Medien

Tabelle 15: Bezeichnung und Zusammensetzung verwendeter Puffer und Medien

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|--------------------|---|
| Anodenpuffer 1 | 30mM Tris-Base, 20% (v/v) Methanol |
| Anodenpuffer 2 | 300mM Tris-Base, 20% (v/v) Methanol |
| 2x DLB | 20mM Tris/HCl (pH 7,4), 2% (w/v) SDS |
| Kathodenpuffer | 25mM Tris-Base, 40mM 6-Amino-Caprinsäure, 20% (v/v) Methanol |
| 4x Sammelgelpuffer | 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,4 % (w/v) SDS |
| 5x SDS Ladepuffer | 312,5mM Tris/HCl (pH 6,8), 10% (w/v) SDS, 50%(v/v) Glycerol, 10% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau |
| Stripping-Puffer | 62,5mM Tris/HCl (pH 6,8), 2% (w/v) SDS, 0,7% (v/v) β -Mercaptoethanol |
| 4x Trenngelpuffer | 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4 % (w/v) SDS |
| TTBS | 20mM Tris, 137mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween20 |

7.4 Taqmansonden

Tabelle 16: Bezeichnung, Spezies und Hersteller der verwendeten Taqmansonden

| Gen | Sonde | Spezies | Applikation | Hersteller |
|---------------|---------------|-----------|---------------------|--------------------|
| Il-6 | Mm99999064_m1 | <i>ms</i> | quantitative RT-PCR | Applied Biosystems |
| Il-1 β | Mm01336189_m1 | <i>ms</i> | quantitative RT-PCR | Applied Biosystems |
| KC | Mm04207460_m1 | <i>ms</i> | quantitative RT-PCR | Applied Biosystems |
| TNF- α | Mm00443258_m1 | <i>ms</i> | quantitative RT-PCR | Applied Biosystems |

7.5 Oligonukleotide

Tabelle 17: Bezeichnung, Sequenzen und Spezies der verwendeten Oligonukleotide

| Primername | Sequenz | Spezies | Applikation |
|------------------------|-------------------------------------|-----------|-------------------------|
| DLG5 ATCG 665, forward | 5'-GGCTGAATCC TGATTATGAGA-3' | <i>ms</i> | Genotypisierungs-PCR |
| DLG5 ATCG 666, reverse | 5'-TGAGTCCAAG AGGCACAAGT-3' | <i>ms</i> | Genotypisierungs-PCR |
| DLG5 ATCG 667, forward | 5'-AGACATTTATATG CTCCGGTCTTGG-3' | <i>ms</i> | Genotypisierungs-PCR |
| Dlg5, forward | 5'-GAAGACTCAG CCTCACCTGC-3' | <i>ms</i> | semiquantitative RT-PCR |
| Dlg5, reverse | 5'-CTGAGGGCAT GATGGACAGG-3' | <i>ms</i> | semiquantitative RT-PCR |
| GAPDH, forward | 5'-CCGGGGCTGG CATTGCTCTCA-3' | <i>ms</i> | semiquantitative RT-PCR |
| GAPDH, reverse | 5'-CTTGCTCAGTGT CCTTGCTGGGG-3' | <i>ms</i> | semiquantitative RT-PCR |
| siDLG5_1 | 5'-GAAGGATGAC GTGGACATGCT-3' | <i>hu</i> | siRNA-Transfektion |
| Vil-cre, forward | 5'-GTGTGGGACAG AGAACAAACC-3' | <i>ms</i> | Genotypisierungs-PCR |
| Vil-cre, reverse | 5'-ACATCTTCAG GTTCTGCGGG-3' | <i>ms</i> | Genotypisierungs-PCR |

7.6 Kits

Tabelle 18: Bezeichnung und Name des Herstellers verwendeter Kits

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|--------------------------------------|
| Advantage RT-for-PCR Kit | Clontech, Heidelberg |
| ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit | Millipore/ Merck, Darmstadt |
| Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay | BioRad, München |
| DC Protein Assay | BioRad, München |
| DNA-Polymerase GoTaq™ | Promega, Madison, USA |
| DNase I | Qiagen, Hilden |
| DNeasy Blood and Tissue Kit | Qiagen, Hilden |
| ECL-PLUS | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Lamina Propria Dissociation Kit mouse | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| Mouse KC CytoSet™ | BioSource Europe, Nivelles, Belgien |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| Taqman® Gene Expression Assay | Applied Biosystems |
| Vectastain Elite ABC Kit | Vector Laboratories, Burlingame, USA |

8 Danksagung

Dem Direktor des Instituts für klinische Molekularbiologie (IKMB) und der I. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Herrn Prof. Dr. Stefan Schreiber, danke ich für die Möglichkeit, dass ich meine Dissertation im IKMB durchführen konnte.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Rosenstiel gilt mein ganz besonderer Dank für die Überlassung des Themas meiner Dissertation und die hervorragende fachliche Betreuung und Beratung während der Experimentalphase sowie bei der schriftlichen Ausarbeitung meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Christian Sina und Frau Dr. Maren Falk-Paulsen danke ich für die direkte Betreuung, verbunden mit viel Engagement und konstruktiver Kritik auf dem Weg von meinen ersten Experimenten bis hin zu deren schriftlichen Darstellung und Diskussion.

Großer Dank gilt auch dem ganzen Team der Abteilung „Zellbiologie“ des IKMB (insbesondere Dr. Stefanie Derer, Dr. Olga Gavrilova, Dr. Gunnar Jacobs, Dr. Marlene Jentzsch, Dr. Jan Kuiper, Dr. Simone Lipinski, Anne Luzius, Dr. Andreas Till, sowie Tanja Klostermeier, Sabine Kock, Dorina Ölsner, Maren Reffelman und Tatjana Schmidtke), die mir bei meiner Arbeit im Labor mit ihrer fachlichen Kompetenz stets zur Seite standen. Ferner danke ich den Mitarbeitern der zentralen Tierhaltung für ihre fachkundige Betreuung der Mäuse.

Ganz herzlichen danke ich an dieser Stelle auch meinen Eltern, Prof. Dr. Reinhard und Dr. Johanna Hildebrand, die mich während meines Studiums und der Promotion engagiert begleitet und unterstützt haben.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name Friederike Louise Hildebrand

Geburtsdatum 18. April 1985

Geburtsort Köln

Schulausbildung:

1991 – 1995 Bodelschwingschule, Münster

1995 – 2004 Abitur Bischöfliches Mädchengymnasium Marienschule, Münster

Studium und Beruf:

2004 – 2011 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

09/2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

02 – 12/2010 Praktisches Jahr (Kiel, Eckernförde, Bangalore/Indien, Heide)

05/2011 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

seit 10/2011 Assistenzärztin der Medizinischen Klinik I,
Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Lübeck

Promotion:

seit 09/2007 Institut für klinische Molekularbiologie, Kiel

Thema Die Bedeutung des *disc large homolog (DLG) 5* Gens im murinen intestinalen Epithel bei experimenteller Darmerkrankung

Doktorvater Prof. Dr. med. Philip Rosenstiel

Veröffentlichung:

NGFN (Nationales Genomforschungsnetzwerk) Meeting 2007, Heidelberg. DLG5 is critically involved in epithelial homeostasis in intestinal inflammation and genetic deficiency causes severe hydrocephalus. Philip Rosenstiel, Peter Brodin, Gunnar Jacobs, Andreas Till, Erik Michaelsson, Xiufeng Xu, Johan Jirholt, Andreas Till, John Williams, Christian Sina, **Friederike Hildebrand**, Matti Förster, Monika Stoll und Stefan Schreiber.

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, Häslar R, Nikolaus S, Fölsch UR, RoseJohn S, Jiang HP, Li J, Schreiber S, Rosenstiel P.