

Aus dem Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie  
(Prof. Dr. rer. nat. J. Wienands)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Die Rolle des Glukokortikoid-Rezeptors bei der Colitis Ulcerosa im Mausmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
für Humanmedizin  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Garrit Karsten Meers**

aus

Kassel

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer/in: Prof. Dr. H. Reichardt

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. S. A. Johnsen

### **Prüfungskommission**

Referent/in: Prof. Dr. H. Reichardt

Ko-Referent/in: PD Dr. Fred Lühder

Drittreferent/in: Prof. Dr. Ralf Dressel (Promotor)

Datum der mündlichen Prüfung: 04.10.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Rolle des Glukokortikoid-Rezeptors bei der Colitis Ulcerosa im Mausmodell" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 04.10.2022

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

**Meers GK**, Bohnenberger H, Reichardt HM, Lühder F, Reichardt SD (2018): Impaired resolution of DSS-induced colitis in mice lacking the glucocorticoid receptor in myeloid cells. *PLoS One* 13, e0190846

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen.....	1
1.1.1 Klinik, Diagnostik und Therapie der Colitis Ulcerosa .....	1
1.1.2 Pathogenese der Colitis Ulcerosa .....	5
1.2 Intestinales Immunsystem, Toleranz und lokale Signale.....	9
1.3 Makrophagen.....	10
1.3.1 Klassische und alternative Aktivierung, sowie Effektor-Wirkung .....	11
1.3.2 Makrophagen, Autoimmunität und ihre Rolle im Darm .....	13
1.4 Glukokortikoide.....	14
1.4.1 Der Glukokortikoid-Rezeptor und seine Funktionalität.....	15
1.4.2 Wirkung von Glukokortikoiden auf Makrophagen .....	17
1.5 Tierversuche .....	18
1.5.1 DSS-induzierte Colitis als Krankheitsmodell für die Colitis Ulcerosa.....	19
1.5.2 Transgene Mauslinien.....	20
1.6 Hypothese und Zielsetzung .....	21
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.1 Material .....	23
2.1.1 Geräte und Instrumente.....	23
2.1.2 Labormaterialien .....	24
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	25
2.1.4 Kommerzielle Kits.....	27
2.1.5 Lösungen und Puffer.....	27
2.1.6 Antikörper und Primer.....	28
2.1.7 Software .....	29
2.2 Tierversuche mit Mäusen als Modellorganismen.....	30
2.2.1 Verwendete Mauslinien .....	30
2.2.2 DSS-induzierte Colitis als Modell der Colitis Ulcerosa in Mäusen .....	30
2.2.3 DAI-Score der Colitis.....	31
2.2.4 Probengewinnung .....	32
2.3 Molekulardiagnostische Methoden.....	33
2.3.1 RNA-Isolation, Gewinnung der PolyA-RNA und cDNA-Synthese .....	33
2.3.2 Quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion.....	35
2.3.3 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i> .....	35
2.4 Histologie.....	36
2.4.1 Herstellung der Präparate.....	36

---

2.4.2	Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	37
2.4.3	Scoring der Präparate.....	37
2.4.4	Immunhistochemie.....	37
2.5	Statistische Analyse.....	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
3.1	Auswirkung der GR-Ablation in myeloischen Zellen (GR <sup>lysM</sup> ) auf die DSS-induzierte Colitis in Mäusen auf C57/Bl6-Hintergrund.....	39
3.1.1	Krankheitsausprägung der DSS-induzierten Colitis .....	39
3.1.2	Systemische Zytokinsekretion im Rahmen der DSS-induzierten Colitis.....	40
3.1.3	Histologische Beurteilung der Entzündungsreaktion im Colon im Rahmen der DSS-induzierten Colitis .....	41
3.1.4	Regulation der Genexpression im Dickdarm.....	44
3.2	Auswirkung der GR-Ablation in myeloischen Zellen (GR <sup>lysM</sup> ) auf die DSS-induzierte Colitis in Mäusen auf Balb/C-Hintergrund.....	46
3.2.1	Krankheitsausprägung der DSS-induzierten Colitis .....	46
3.2.2	Regulation der Genexpression im Dickdarm.....	47
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>49</b>
4.1	Rolle von Makrophagen in der Pathogenese der Colitis .....	49
4.2	Auswirkung der GR-Ablation in myeloischen Zellen .....	49
4.3	Histopathologisches Korrelat der Entzündung und Makrophageninfiltration .....	50
4.4	Zytokinmilieu im Rahmen der Entzündungs- und Rekonvaleszenzphase.....	51
4.5	Einfluss von Glukokortikoiden auf die Entzündung und Gewebereparatur, therapeutische Ansätze.....	53
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>56</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Barriere der Colonschleimhaut.....	9
Abbildung 2. Induktion der Colitis durch DSS.....	19
Abbildung 3. Krankheitsausprägung der DDS-induzierten Colitis in GR <sup>lysM</sup> - und GR <sup>flox</sup> -Mäusen auf einem C57/B16-Hintergrund.....	40
Abbildung 4. IL-6 Serumspiegel in der DDS-induzierten Colitis in GR <sup>lysM</sup> - und GR <sup>flox</sup> -Mäusen.....	41
Abbildung 5. HE-Färbung von Colonschnitten in der DSS-induzierten Colitis in GR <sup>lysM</sup> - und GR <sup>flox</sup> -Mäusen.....	41
Abbildung 6. Histologie Score der Colontzündung in der DSS-induzierten Colitis in GR <sup>lysM</sup> - und GR <sup>flox</sup> -Mäusen.....	42
Abbildung 7. Immunhistochemische Beurteilung der Colontzündung in der DSS-induzierten Colitis in GR <sup>lysM</sup> - und GR <sup>flox</sup> -Mäusen.....	43
Abbildung 8. Regulation der Genexpression im Dickdarm in der DSS-induzierten Colitis in GR <sup>lysM</sup> - und GR <sup>flox</sup> -Mäusen.....	45
Abbildung 9. Krankheitsausprägung in der DDS-induzierten Colitis in GR <sup>lysM</sup> - und GR <sup>flox</sup> -Mäusen auf Balb/C-Hintergrund.....	47
Abbildung 10. Regulation der Genexpression in der DSS-induzierten Colitis in GR <sup>lysM</sup> - und GR <sup>flox</sup> -Mäusen auf Balb/C-Hintergrund.....	48

---

## Tabellenverzeichnis

Abbildung 1. Barriere der Colonschleimhaut.....	9
Abbildung 2. Induktion der Colitis durch DSS.....	19
Abbildung 3. Krankheitsausprägung der DDS-induzierten Colitis in GR <sup>lysM</sup> - und GR <sup>flox</sup> -Mäusen auf einem C57/B16-Hintergrund.....	40
Abbildung 4. IL-6 Serumspiegel in der DDS-induzierten Colitis in GR <sup>lysM</sup> - und GR <sup>flox</sup> -Mäusen.....	41
Abbildung 5. HE-Färbung von Colonschnitten in der DSS-induzierten Colitis in GR <sup>lysM</sup> - und GR <sup>flox</sup> -Mäusen.....	41
Abbildung 6. Histologie Score der Colontzündung in der DSS-induzierten Colitis in GR <sup>lysM</sup> - und GR <sup>flox</sup> -Mäusen.....	42
Abbildung 7. Immunhistochemische Beurteilung der Colontzündung in der DSS-induzierten Colitis in GR <sup>lysM</sup> - und GR <sup>flox</sup> -Mäusen.....	43
Abbildung 8. Regulation der Genexpression im Dickdarm in der DSS-induzierten Colitis in GR <sup>lysM</sup> - und GR <sup>flox</sup> -Mäusen.....	45
Abbildung 9. Krankheitsausprägung in der DDS-induzierten Colitis in GR <sup>lysM</sup> - und GR <sup>flox</sup> -Mäusen auf Balb/C-Hintergrund.....	47
Abbildung 10. Regulation der Genexpression in der DSS-induzierten Colitis in GR <sup>lysM</sup> - und GR <sup>flox</sup> -Mäusen auf Balb/C-Hintergrund.....	48



## Abkürzungsverzeichnis

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
Arg-1	Arginase Typ 1
B-Zellen	B-( <i>bone marrow</i> )-Lymphozyt (B urspr. <i>bursa fabricii</i> )
CCL-	CC-Chemokinligand
CD	Oberflächendifferenzierungsmarker von Zellen, <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure, <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CXCL-	CXC-Chemokinligand
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAI	Krankheitsaktivitätsindex, <i>disease activity index</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DSS	Dextrannatriumsulfat, <i>dextran sodium sulfate</i>
ELISA	enzymgekoppelten Immunadsorptionstest, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
F4/80	Maus-Zelloberflächenglykoprotein auf Makrophagen, <i>EMR1 = EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>
FCS	Fetales Kälberserum, <i>fetal calf serum</i>
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLA	humanes Leukozyten-Antigen, <i>human leukocyte antigen</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig A/G	Immunglobulin Klasse A/Klasse G
IL-	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase, <i>inducible nitric oxide synthase</i>
mRNA	Boten-RNA, <i>messenger-RNA</i>
NET	neutrophile extrazelluläre Netze, <i>neutrophil extracellular traps</i>
NF- $\kappa$ B	kappa leichte Ketten verstärkender nuclearer Faktor, <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer</i>
PAMPs	pathogen-assoziierte molekulare Muster, <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, <i>phosphate-buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
RT-qPCR	Quantitative-reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion, <i>reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
STAT	Transkriptionsfaktorproteine, <i>signal transducers and activators of transcription</i>
T-Zelle	T-(Thymus)-Lymphozyt
TGF	transformierender Wachstumsfaktor, <i>transforming growth factor</i>
Th-1/2/17	T-Helfer-Zelle Typ 1/2/17
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha, <i>tumor necrosis factor alpha</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Der Gastrointestinal-Trakt hat neben der Haut eine der größten Oberflächen unseres Körpers, über die wir mit der Umwelt interagieren und verschiedenste Substanzen austauschen. Neben der ortsständigen kommensalen Darmflora können hier auch pathogene Organismen in Kontakt mit der Darmschleimhaut geraten. Eine gut abgestimmte Kontrolle des Immunsystems sowohl in Bezug auf die kommensale als auch auf die potenziell pathogenen Organismen ist unabdingbar. Die Barriere-Funktion der Darmschleimhaut spielt demnach eine entscheidende Rolle, Organismen daran zu hindern in den Körper einzudringen (Perez-Lopez et al. 2016). Reagiert das mukosale Immunsystem im Rahmen einer Abwehrreaktion übermäßig oder andauernd, insbesondere auch auf die reguläre Darmflora, resultiert hieraus die klinische Ausprägung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Ursächlich sind höchstwahrscheinlich vor allem Defekte in der Barriere-Funktion als auch der respondierenden mukosalen Immunantwort (Podolsky 2002)

### 1.1.1 Klinik, Diagnostik und Therapie der Colitis Ulcerosa

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen sind eine Gruppe von Krankheiten mit entzündlichen Prozessen im Gastrointestinal-Trakt, die in ihrer klinischen Ausprägung bzw. den auftretenden Symptomen zahlreiche Gemeinsamkeiten besitzen. Die häufigsten Formen sind Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn (Danese und Fiocchi 2011). Die Beschreibung der Colitis Ulcerosa, ursprünglich als idiopathische Colitis benannt, erfolgte bereits im 19. Jahrhundert (Wilks und Moxon 1889). Morbus Crohn wurde zuerst 1932 durch den späteren Namensgeber als „regionale Ileitis“ beschrieben (Crohn et al. 1932). Während bei Colitis Ulcerosa die Entzündung auf die Schleimhaut des Dickdarms begrenzt ist, betrifft Morbus Crohn den gesamten Gastrointestinal-Trakt. Klinisch äußern sich chronisch-entzündliche Darmerkrankungen durch Symptome wie Bauchschmerzen, Durchfall zum Teil mit Blutbeimengungen, sowie Gewichtsverlust und beginnen meist im frühen Erwachsenenalter. Die Colitis Ulcerosa ist im Gegensatz zum Morbus Crohn weniger komplikationsanfällig, hat häufiger einen milden Krankheitsverlauf und kann als Ultima Ratio durch Kolektomie geheilt werden (Podolsky 2002). Jedoch ist trotz intensiver Bemühungen der Pathomechanismus beider Erkrankungen bis heute nicht abschließend geklärt.

Colitis Ulcerosa tritt in Deutschland mit einer Inzidenz von circa 4 pro 100.000 Einwohner auf, die Prävalenz wird mit 90 pro 100.000 Einwohner angenommen. Eine wahrscheinlich erhebliche Unterschätzung dieser Daten ist jedoch anzunehmen, da einerseits aufgrund

fehlender Melderegister in Deutschland nur schlechte epidemiologische Daten vorliegen und andererseits leichte Erkrankungen gelegentlich auch als Reizdarm oder Hämorrhoidalleiden fehldiagnostiziert werden. Schätzungen gehen von 150.000 von Colitis Ulcerosa Betroffenen in Deutschland aus (Timmer und Goebell 1999; Kucharzik et al. 2020b). Der Erkrankungsgipfel (altersbezogene höchste Inzidenz) liegt in der Gruppe der 16 - 24-Jährigen. Die Inzidenzen in Deutschland blieben innerhalb der letzten Jahr stabil (Ott C et al. 2008), ebenso in Europa und Nordamerika, während sie in den Schwellenländern in Südamerika, Afrika und Südostasien seit 1990 in allen Altersgruppen steigen (Ng et al. 2017). Von West nach Ost zeigt sich innerhalb Europas ein Gradient mit deutlich höheren Inzidenzen in den osteuropäischen Staaten (Burisch et al. 2014). Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen sind allgemein mit einer schlechteren Lebensqualität, wirtschaftlichen Belastungen und einer erhöhten Morbidität verbunden, auch die Hospitalisierungsrate und Anzahl an notwendigen chirurgischen Eingriffen ist erhöht (Abraham und Cho 2009; Abraham et al. 2012; Mehta 2016).

Betroffene fallen üblicherweise durch anhaltenden imperativen Stuhldrang, Durchfälle, Tenesmen und rektalen Blutabgang auf. In schweren Schüben sind zudem auch Tachykardie, Gewichtsverlust und eine abdominelle Abwehrspannung möglich (Kucharzik et al. 2020a). Charakteristisch für den Verlauf der Colitis Ulcerosa sind abwechselnde Episoden von Krankheitsschüben und symptomarmen bzw. -freien Intervallen (Remission). Seltener treten kontinuierliche Beschwerden auf (Langholz et al. 1994) Neben der klinischen Symptomatik sind für die Diagnosestellung, die Anamnese und die laborchemischen, sonographischen, endoskopischen und histologischen Befunde relevant. In der Stuhluntersuchung hat sich in der klinischen Anwendung vor allem Calprotectin als fäkaler Neutrophilen-Marker für die lokale Entzündungsaktivität etabliert, der mit der klinischen und endoskopischen Entzündungsaktivität korreliert (Schoepfer et al. 2009; Lin et al. 2014). Serologisch können bei 63 % der an Colitis Ulcerosa Erkrankten perinukleäre Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper (pANCA) nachgewiesen werden (Linskens et al. 2002; Kucharzik et al. 2020a). Die Diagnostik, aber auch die Verlaufsbeurteilung kann durch die Abdomen-Sonographie unterstützt werden. Es können Entzündungen im Bereich des Dickdarms mit einer Sensitivität von bis zu 90 % detektiert werden. Die Sonographie dient als unspezifischer Parameter zur Abgrenzung der Ursache (Parente et al. 2003). Zudem kann die Krankheitsausdehnung (Pascu et al. 2004) und die Aktivität bei bekannter Colitis Ulcerosa gut mittels der Abdomen-Sonographie bestimmt werden (Parente et al. 2010). Daneben stellt weiterhin die endoskopische Darstellung des Darms (Koloskopie) ein wichtiges Standbein in Diagnostik und Ausbreitungs- und Aktivitätsbestimmung dar. Mittels Endoskopie ist es möglich zur histopathologischen Diagnostik Biopsien zu entnehmen, auch um potentiell maligne Transformationen zu detektieren (Kucharzik et al. 2020b). Histopathologische Korrelate der Entzündung sind eine veränderte Krypten-Architektur und -Atrophie (Tanaka et al. 1999), die transmukosale Entzündung im Sinne eines diffus gesteigerten Gehaltes an mononukleären Zellen in der Lamina propria (Jenkins et al. 1997) und die

Reduktion der Zahl an Becherzellen bzw. deren Muzingehalt, sowie ein kontinuierliches Verteilungsmuster der Entzündung von aboral nach oral (Dejaco et al. 2003). Das Ausmaß der Entzündungsaktivität orientiert sich am Umfang der Gewebeeinfiltration durch neutrophile Granulozyten, sowie der damit verbundenen Schädigungen des Darmepithels, Kryptenabszessen und ulzerösen Läsionen (Jenkins et al. 1997). Komplikationen der Erkrankung sind neben den klinischen Begleiterscheinungen, wie Malabsorption, Flüssigkeitsverlust über die chronischen Diarrhoen, Anämie durch chronischen rektalen Blutabgang, auch die Ausbildung von Neoplasien, insbesondere im Sinne eines kolorektalen Karzinoms. Vor allem Strikturen sind hochverdächtig und sollten immer histopathologisch abgeklärt werden (Rutter et al. 2004). Das Risiko eines kolorektalen Karzinoms ist bei an Colitis Ulcerosa Erkrankten insbesondere bei hohem Krankheitsausmaß erhöht. Angaben über die Höhe des Risikos sind unterschiedlich, aktuelle Untersuchungen konnten nur noch geringer erhöhte Risiken nachweisen (kumulatives kolorektales Karzinomrisiko bei Colitis Ulcerosa von 1 % in 10 Jahren, 3 % in 20 Jahren und 7 % in 30 Jahren Erkrankungszeit). Dieses geringere Risiko kann mit dem verbesserten Überwachungsprogramm und der wirkungsvolleren entzündungskontrollierenden medikamentösen Therapie in Verbindung gebracht werden (Annese et al. 2013; Selinger et al. 2014). Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass insbesondere die Gesundheit der Darmschleimhaut bzw. die zügige Ausheilung das klinische Outcome verbessern (Neurath und Travis 2012). Ebenso konnte eine Assoziation zwischen Mukosaheilung und der Erreichung einer steroidfreien Remission, sowie niedrigeren Kolektomieraten gezeigt werden (Reinink et al. 2016; Shah et al. 2016).

Im Rahmen der Diagnostik ist die Klassifikation der Ausprägung ein relevanter Schritt. Sie ist sogleich prognostisch aussagekräftig, als auch therapieentscheidend. Die Ausdehnung wird in drei Gruppen eingeteilt (Montreal-Klassifikation): Proktitis (auf das Rektum limitiert), Linksseitencolitis (Befall bis zur linken Colon-Flexur) und ausgedehnte Colitis (über die linke Flexur hinaus bis zur Pancolitis) (Silverberg et al. 2005). Insbesondere für die Therapie mit 5-Aminosalicylsäure-Präparaten (5-ASA-Präparate), wie Mesalazin, die lokal immunmodulatorisch wirken, entscheidet das Ausmaß der Erkrankung über die lokale (Rektalschaum oder Einläufe) oder orale Applikation (Marteau et al. 2005). Die Auswahl der Therapie berücksichtigt zur Remissionsinduktion das Ausmaß (Montreal-Klassifikation) und die Schwere des Schubes; nach der Schubbehandlung wird die remissionserhaltende Therapie angeschlossen. Grundsätzlich befassen sich die Behandlungsstrategien bisher in der ersten Linie mit der Entzündungskontrolle: eingesetzt werden Glukokortikoide, 5-ASA-Präparate (wie Mesalazin), immunmodulierende Medikamente (wie Azathioprin, Cyclosporin A) und Biologika (Vindigni et al. 2016; Kucharzik et al. 2020a).

Mesalazin wird vor allem bei leichter bis mittelschwerer Colitis Ulcerosa eingesetzt und bei Bedarf durch lokale (Budesonid) oder systemische (Prednisolon) Glukokortikoide ergänzt. Bei schweren Verläufen werden diese bereits initial eingesetzt und durch Immunsuppressiva (Azathioprin, Cyclosporin A) oder verschiedene Biologika ergänzt. Als Ultima Ratio bei therapieresistenten Verläufen oder bereits aufgetretenen Neoplasien führt die totale

Kolektomie zur Ausheilung, jedoch verbunden mit negativen Begleiterscheinungen, wie einer erhöhten Stuhlfrequenz, Inkontinenz und perioperativem Risiko (Vindigni et al. 2016; Kucharzik et al. 2020a). Die bei der Colitis Ulcerosa eingesetzten Biologika sind monoklonale Antikörper, die auf die Blockierung von TNF- $\alpha$  (Infliximab, Adalimumab) und Integrin- $\alpha$ 4 (Vedolizumab) abzielen (Shah und Mayer 2010; Feagan et al. 2013). Neuere Studien haben auch positive Wirkungen durch Ustekinumab, der gegen die Zytokine IL-(Interleukin)-12 und IL-23 wirkt, sowohl in der Induktions- als auch Erhaltungstherapie gezeigt (Sands et al. 2019). Während mehrere klinische Studien vielversprechende Ergebnisse lieferten, wurde die klinische Anwendung dieser Biologika von unerwünschten Wirkungen begleitet, darunter Infusionsreaktionen, infektionsbedingte Mortalität, Malignität und Autoimmunität (Pithadia und Jain 2011). Trotz der Fortschritte bei der Therapie mit monoklonalen Antikörpern und guten Erfahrungen mit 5-ASA-Präparaten bei leichten Verläufen sind Glukokortikoide weiterhin ein zentraler Bestandteil insbesondere bei der Schubtherapie und bei schwereren Verläufen. Typische Dosierungen betragen 1 mg/kg Körpergewicht pro Tag Prednisolon, wobei in der Regel nicht mehr als 40 - 60 mg pro Tag verabreicht werden, da sonst die Nebenwirkungen dem Nutzen überwiegen. 40 % der Betroffenen reagieren mit Remission auf die Therapie, sodass bei gebesserter Symptomatik die Therapie reduziert und schließlich abgesetzt und damit auf ein remissionserhaltendes Regime z. B. mit Mesalazin gewechselt werden kann. Eine weitere Gruppe wird steroidabhängig, das bedeutet, es kann nach der Schubtherapie trotz gebesserter Symptomatik nicht ohne erneutes Aufflammen des Schubes vom Glukokortikoid entwöhnt werden. Ein Teil der Erkrankten (ca. 10 – 20 %) reagiert auch auf Glukokortikoide nicht mit ausreichender Besserung der Symptomatik und müssen mit umfassenderen Therapieregimen behandelt werden. Eine Dauertherapie mit Glukokortikoiden schließt sich aufgrund des ausgeprägten Nebenwirkungsprofils mit Osteoporosen, Osteonekrosen, Infektionen, Hyperglykämie und gastralen Ulcera an (Pithadia und Jain 2011; Kucharzik et al. 2020a). Alternative Strategien zur Optimierung des Nebenwirkungsprofils setzen an der Aufnahme und dem Wirkort von Glukokortikoiden an und vermitteln z. B. mittels Nanocarrier-Systemen eine gezieltere Wirkung an Zielstrukturen (Lühder und Reichardt 2017). Erste positive Ergebnisse wurden bereits in einem Mausmodell für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen durch Anwendung eines Glukokortikoid-Copolymer-Konjugats gezeigt. Dieses konnte einerseits die Krankheitssymptome verbessern, andererseits die Entwicklung von Osteoporose verhindern (Ren et al. 2014; Ren et al. 2015).

In Anbetracht der aktuellen Erkenntnisse sind noch weitere Forschungsanstrengungen bezüglich der Pathogenese aber auch der Therapieoptimierung notwendig. Insbesondere sollten neben der Entzündungskontrolle, mit der Therapie auch auf bekannte oder noch unbekannte pathogene Faktoren abgezielt werden. Ein aktueller Ansatz ist zum Beispiel die fäkale mikrobiellen Transplantation (Imdad et al. 2018).

### 1.1.2 Pathogenese der Colitis Ulcerosa

Ursächlich für die Entwicklung einer Colitis Ulcerosa ist nach aktuellem Wissensstand eine Kombination aus mehreren extrinsischen und intrinsischen Faktoren. Neben der genetischen Prädisposition spielen verschiedene Umwelteinflüsse, die Zusammensetzung der mikrobiellen Darmflora und die mukosale Immunreaktion im Darm eine Rolle (Danese und Fiocchi 2011; Porter et al. 2020).

Bisher konnten mehr als 240 Genloki identifiziert werden, die mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert sind. Viele dieser Gene sind an Entzündungsreaktionen, der Erkennung pathogener Mikroorganismen und der epithelialen Barriere-Funktion beteiligt. Eine praktische Konsequenz konnte sich bisher aber nicht ableiten lassen (Furey et al. 2019). 67 % der Genloki sind sowohl mit Colitis Ulcerosa als auch mit Morbus Crohn assoziiert (Jostins et al. 2012). In Zwillingsstudien zeigte sich eine Konkordanzrate von nur 6,3 %, im Gegensatz zu 60 % bei Morbus Crohn (Porter et al. 2020), allerdings wiesen konkordante eineiige Zwillinge ähnliche Krankheitsausmaße auf. Manche der Genloki sind zudem mit anderen Autoimmunerkrankungen an der Wirbelsäule (Morbus Bechterew), der Schilddrüse, an Leber und Gallenwegen oder der Psoriasis assoziiert und erklären daher Komorbidität mit der Colitis Ulcerosa. Auch für die atopische Dermatitis und Multiple Sklerose konnten Komorbiditäten nachgewiesen werden (Kosmidou et al. 2017; Alinaghi et al. 2020; Porter et al. 2020; Shi et al. 2020). Daneben sind die stärksten für Colitis Ulcerosa spezifischen Genloki mit den HLA-(humanes Leukozyten-Antigen, *human leukocyt antigen*)-Regionen assoziiert. Beschrieben sind 16 HLA-Allel-Assoziationen, darunter unter anderem HLA-DRB1\*01\*03 (Goyette et al. 2015). Insgesamt spielen genetische Prädispositionen eine zwar kleine, aber doch eindeutige Rolle in der Risikoerhöhung für Colitis Ulcerosa. Jedoch konnten nicht bei allen Erkrankten die bisher bekannten prädisponierenden genetischen Loci nachgewiesen werden (Lee und Cleynen 2019). Weitere Faktoren wie die Umwelt, die lokale Immunreaktion und die Dysfunktion der epithelialen Barriere sind daher zu berücksichtigen.

Neben der genetischen Prädisposition spricht das erhöhte Risiko für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen bei Personen mit westlich geprägtem Lebensstil eine große Rolle bei der Erkrankung. Insbesondere städtischer Lebensstil, Umweltverschmutzung, fett- und zuckerreiche Ernährung, häufige Anwendung von Antibiotika und bessere Hygiene werden in Verbindung mit den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen gebracht (Porter et al. 2020). Bei zweieiigen Zwillingen ist sowohl eine symptomatische Mumps-Infektion in der Kindheit, die Einnahme oraler Kontrazeptiva, eine höhere Rate durchgemachter Gastroenteritiden und das Verbringen von mehr Zeit mit Tieren mit Colitis Ulcerosa assoziiert. Für das Rauchen von Tabak zeigte sich ein umgekehrter Effekt (Ng et al. 2012). Eine andere Untersuchungen ergab Hinweise darauf, dass Rauchen selbst nicht zu einem geringeren Risiko für eine Colitis Ulcerosa führt, sondern die Raucherentwöhnung das Erkrankungsrisiko erhöhte (Ananthkrishnan 2015). Eine frühe Exposition gegenüber verschiedenen Infektionen kann demnach eine Rolle bei der Entwicklung von

chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen spielen. Im Rahmen der Infektion könnten Fragmente der auslösenden Mikroorganismen zurückbleiben und zu langfristigen Veränderungen der Darmflora und einer Reaktivität des lokalen Immunsystems führen (Halfvarson et al. 2006).

Des Weiteren wurde entdeckt, dass das Mikrobiom bei von einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Betroffenen weniger vielfältig ist, als bei gesunden Probanden (Lloyd-Price et al. 2019). Dieselben Ergebnisse konnten auch für das Virom und Mykobiom nachgewiesen werden (Ott SJ et al. 2008; Norman et al. 2015; Qiu et al. 2017; Zuo et al. 2019). Bisher ist nicht abschließend geklärt, ob die Dysbiose eine kausale Rolle in der Pathogenese spielt oder Folge der Entzündungsreaktion ist. Jedoch konnte in mehreren kontrollierten klinischen Studien chronisch-entzündliche Darmerkrankungen therapeutisch mit fäkaler mikrobieller Transplantation von gesunden Spendern die Colitis Ulcerosa behandelt werden (Sha et al. 2014; Moayyedi et al. 2015; Rossen et al. 2015; Paramsothy et al. 2017; Costello et al. 2019). Dementsprechend wird wiederholt die Wiederherstellung der mikrobiellen Diversität als therapeutischer Ansatz diskutiert. Die Dysbiose scheint die Integrität des Epithels zu beeinträchtigen bzw. ebenso eine epitheliale Dysfunktion zu erzeugen (Glotzer et al. 1981), die den Einfluss genetischer und umweltbezogener Faktoren verstärkt.

Als histopathologisches Korrelat zeigen sich subepitheliale Entzündungsherde die häufig als gestörte epitheliale Barriere und damit als pathogener Faktor der Krankheitsentwicklung betrachtet werden. Störungen können durch eine veränderte oder reduzierte Sekretion des Mukus oder direkte Defekte der epithelialen Oberfläche, wie z. B. Lücken in den epithelialen *tight junctions* entstehen (Turner 2009; McCauley und Guasch 2015). Getragen wird diese Hypothese dadurch, dass die Schleimschichtdicke durch die Einnahme von nicht-steroidalen Antiphlogistika oder Kontakt mit Nahrungsbestandteilen wie Emulgatoren reduziert werden kann. Dies scheint ein weiterer Auslöser einer Colitis zu sein (Klein und Eliakim 2010; Chassaing et al. 2015). Eine direkte Schädigung der epithelialen Barriere wird im Rahmen eines aktiven Schubes einer Colitis Ulcerosa durch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor alpha, *tumor necrosis factor alpha*), IFN- $\gamma$  (Interferon-gamma) und IL-13 vermittelt (Watson et al. 2005; Heller et al. 2008). Wiederum üben Wirkstoffe wie z. B. Mesalazin, die die Remission der Colitis Ulcerosa aufrechterhalten, ihre therapeutische Wirkung unter anderem durch den Erhalt der epithelialen Integrität aus (Caltabiano et al. 2011; Cannon et al. 2016). Der Schutz der Integrität der Darmbarriere spielt demnach eine entscheidende Rolle sowohl bei der akuten Therapie als auch der Remissionsbehandlung der Colitis Ulcerosa.

Die lokale Immunreaktion im Rahmen der Entzündung ist ein komplexer Prozess und wird während einer aktiven Colitis Ulcerosa insbesondere auch durch in die Lamina propria einwandernde Immunzellen verstärkt. Dabei wird der histologisch charakteristische Befund der Kryptenabszesse durch das Einwandern einer großen Zahl neutrophiler Granulozyten induziert, die daran anschließend innerhalb der Colonskrypten absterben

(Dinallo et al. 2019; Porter et al. 2020). Typisch ist auch, dass neutrophile Granulozyten unter Stimulation mit  $\text{TNF-}\alpha$  vermehrt NETs (neutrophile extrazelluläre Netze, *neutrophil extracellular traps*), extrazelluläre Fasergeflechte die v.a. aus dem Chromatin der neutrophilen Granulozyten und daran gebundenen antimikrobiellen Proteinen bestehen, bilden und mehr aktives IL-1 $\beta$  exprimieren (Angelidou et al. 2018). Wird die  $\text{TNF-}\alpha$ -Sekretion und damit die NET-Freisetzung gehemmt, so führt dies zu einer abgeschwächten Entzündungsreaktion in Mäusen mit einer DSS-(Dextrannatriumsulfat, *dextran sodium sulfate*)-induzierten Colitis (Dinallo et al. 2019). Der unkontrollierte pro-inflammatorische Zelltod (Nekrose, Nekroptose, NETose) der großen Anzahl an neutrophilen Granulozyten führt zu einem weiter erhöhtem Milieu an pro-inflammatorischen Zytokinen (Angelidou et al. 2018; Dinallo et al. 2019). Im Stuhl oder im Serum nachgewiesene hohe Konzentrationen an S100a8/9-Proteinen (Calprotectin), die normalerweise in neutrophilen Granulozyten gefunden werden (D'Haens et al. 2012; Kalla et al. 2016) unterstützt diese Erkenntnis ebenso wie der serologische Nachweis von perinukleären Anti-Neutrophilen cytoplasmatischen Antikörpern (pANCA) (Satsangi et al. 1998). Weiterhin ist beschrieben, dass NETs immunogene Moleküle festhalten und damit die Krankheitsaktivität weiter aufrecht erhalten können (Dinallo et al. 2019). Die entzündliche Umgebung fördert die Sekretion von weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen, reaktiven Sauerstoffspezies sowie Serin- und Matrix-Metalloproteasen und verstärkt damit den entzündlichen Prozess und die Gewebeschädigung (Phillipson und Kubes 2011).

In der Gesamtschau bilden die Immunzellen der angeborenen Immunreaktion – neutrophile Granulozyten und Makrophagen – nach ihrem Eintreffen im Darmepithel aufgrund eines immunogenen Reizes, z. B. durch Mikroorganismen, die durch eine gestörte mukosale Barriere in die Epithelschicht eindringen konnten, ein pro-inflammatorisches Milieu. Die hierfür verantwortlichen Zytokine, wie IL-1, IL-6 und  $\text{TNF-}\alpha$  fördern einerseits die weitere erworbene Immunreaktion insbesondere durch T-Zellen (Friedrich et al. 2019). Andererseits begünstigen sie die Prägung neu eintreffender Monozyten in ihren pro-inflammatorischen Phänotyp. Die Entzündung unterhält sich somit selbst, was es erschwert, ihr entgegen zu regulieren und Reparaturmechanismen zu induzieren (Mowat et al. 2017; Na et al. 2019).

Das erworbene Immunsystem scheint insbesondere als Ursache der Colitis Ulcerosa eine bedeutende Rolle zu spielen. Die starke genetische Assoziation mit dem HLA-Haplotyp lässt vermuten, dass durch veränderte Antigene die T-Zell-Antwort angetrieben und damit das erhöhte Zytokin-Niveau weiter verstärkt wird. Der genaue Mechanismus der HLA-Wirkung auf die Antigen-Präsentation auf T-Zellen und folgende pathogene T-Zell-Reaktion bleibt bisher ungeklärt (Graham et al. 2018). Ursprüngliche Hypothesen bezüglich einer klassischen Th-2-Immunantwort mit hohen IL-4-, IL-5- und IL-13-Spiegeln die mit Colitis Ulcerosa einhergeht, mussten neu überdacht werden (Bouma und Strober 2003). So konnten auch Th-17-Zellen nachgewiesen (Kobayashi et al. 2008), sowie deren Regulation durch IL-23 gezeigt werden (Teng et al. 2015). Des Weiteren sind IL-13-blockierende



Antikörpertherapien (Anrukinzumab, Tralokinumab) unwirksam (Danese et al. 2015; Reinisch et al. 2015), die Blockierung von IL-23 (Ustekinumab) führt jedoch zu einer klinischen Verbesserung (Sands et al. 2019; Sandborn et al. 2020). Auch genetische Assoziationen mit Veränderungen im Gen für den IL-23-Rezeptor bei an Colitis Ulcerosa Erkrankten wurden identifiziert (Duerr et al. 2006).

Neben Krankheitsprogression ist auch die Remission des lokalen Entzündungsprozesses für den Pathomechanismus relevant. In der klinischen Praxis zeigen sich die Schübe selten spontan rückläufig (Schett und Neurath 2018). Es konnte gezeigt werden, dass T-Zellen in der Lage sind ihren Phänotyp zu verändern. Nach diesem Prozess der Transdifferenzierung zeigen Th-17-Zellen ein charakteristisches Transkriptionsprofil für regulatorische T-Zellen. Vergleiche vor und nach der Transdifferenzierung legen nahe, dass der TGF- $\beta$ -(transformierender Wachstumsfaktor beta, *transforming growth factor beta*)-Signalweg eine Rolle zu spielen scheint (Gagliani et al. 2015). Die Produktion von IL-35, IL-10 und TGF- $\beta$  durch regulatorische T-Zellen unterstützt die Remission (Wirtz et al. 2011; Whitehead et al. 2012). Zudem können regulatorischen T-Zellen im Rahmen einer Colitis pro-inflammatorische Signale unterdrücken (Griseri et al. 2010). Erhärtet wurde diese Erkenntnis durch Analyse eines Th-1-Zell vermittelten Colitis-Modells. Dort waren transferierte, durch TGF- $\beta$  stimulierte, regulatorische T-Zellen in der Lage die Entzündung signifikant zu unterdrücken (Fantini et al. 2006). In einer klinischen Studie wurde Erkrankten mit einem therapierefraktären Morbus Crohn eigene zuvor separierte Ovalbumin-spezifische regulatorische T-Zellen aus dem peripheren Blut transfundiert, woraufhin diese eine dosisabhängige signifikante Abnahme der Krankheitsaktivität zeigten (Desreumaux et al. 2012).

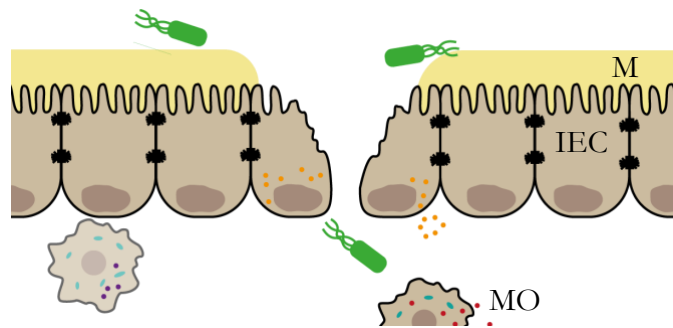
Eine weitere beteiligte Zellpopulation sind regulatorische lymphoide Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie werden durch entzündliche Stimuli aktiviert und sezernieren IL-10. Dadurch unterdrücken sie weitere pro-inflammatorische Prozesse. Durch autokrin sezerniertes TGF- $\beta$  rekrutieren sie weitere regulatorische lymphoide Zellen (Wang et al. 2017). Sie sind sowohl in der murinen als auch humanen Lamina propria zu finden. Im Gegensatz zu T-Zellen blockieren sie die IFN- $\gamma$  und IL-17-Produktion. Die Produktion von IL-22, welches für die Aufrechterhaltung der intestinalen Integrität wichtig ist, beeinträchtigen sie nicht. IL-22, das von regulatorischen lymphoiden Zellen Typ 3 produziert wird, aktiviert epitheliale Stammzellen, induziert die Reparatur der Schleimhaut und verhindert dadurch die Invasion von Mikroorganismen (Pickert et al. 2009; Hanash et al. 2012; Schett und Neurath 2018). Zudem scheinen IL-28 und IL-36 eine Rolle in der Ausheilung der Epithelschäden zu spielen. IL-28 kontrolliert die Proliferation von intestinalen Epithelzellen in Mäusen mit Colitis und beschleunigt durch eine Aktivierung von STAT1 (Transkriptionsfaktorproteine, *signal transducers and activators of transcription*) die Schleimhautheilung (Chiriac et al. 2017). IL-36-Rezeptor-defiziente Mäuse erholten sich nicht nach einer DSS-induzierten Schädigung der Schleimhaut. Auch die IL-22-Expression

war deutlich verringert, was auf eine gegenseitige Beeinflussung der Zytokine schließen lässt (Medina-Contreras et al. 2016).

## 1.2 Intestinales Immunsystem, Toleranz und lokale Signale

Der Darm hat im Rahmen seiner Funktion als für die Resorption von Nahrungsbestandteilen zuständiges Organ mannigfaltige Aufgaben. Mit der großen Oberfläche ist er aber auch in erheblichem Ausmaß äußeren Einflüssen ausgesetzt, die unter anderem auch in der Abwehr von pathogenen Erregern münden können. Viele Stoffe und auch Mikroorganismen, mit denen der Darm in Kontakt gerät, sind jedoch nicht als pathogen einzustufen, sondern wichtig für den normalen physiologischen Ablauf. Zur Unterscheidung hat der Darm eine fein abgestimmte lokale Immunhomöostase.

Das mukosale Immunsystem des Darms besteht aus Lymphknoten, den Zellen der Lamina propria und den intestinalen Epithelzellen, die zusammen für die Aufrechterhaltung der Integrität der Darmbarriere verantwortlich sind (Abbildung 1). Eine ihrer Aufgaben ist es die kommensale Darmflora (Mikrobiom) gegenüber pathogenen Mikroorganismen zu unterscheiden und letztere gezielt abzuwehren. Gerät entweder das Mikrobiom in Dysbalance (Dysbiose) oder die Abwehrreaktion richtet sich auch gegen kommensale Organismen, so kann dies zu Darmerkrankungen führen.



**Abbildung 1. Barriere der Colonschleimhaut**

Wird die Darmbarriere bestehend aus Schleimschicht (Mucus - M), Intestinalen Epithelzellen (IEC) und Immunzellen der Lamina propria, wie Makrophagen (MO) zerstört, können Mikroorganismen durch die Darmbarriere dringen. Sowohl intestinale Epithelzellen als auch Makrophagen sezernieren Immunmediatoren. basierend auf (Coskun 2014) (CC BY)

Residente und infiltrierende Immunzellen in der Lamina propria weisen wichtige Effektor-Funktionen auf. T-Zellen wirken über die Produktion von IL-17 und IL-22, sowie über antimikrobielle Peptide, wie Defensine, und können zytolytisch aktiv werden. Regulatorische T-Zellen verhindern Überempfindlichkeitsreaktionen, beispielsweise auf Nahrungsantigene oder auf die kommensale Flora. Die Epithelien produzieren eine dicke Schleimschicht als erste Schutzbarriere. Die B-Zellen im Epithel sezernieren IgA-(Immunglobulin Klasse A)-Antikörper. Auch die kommensale Flora, die insbesondere im Colon eine beträchtliche Rolle spielt, kann hiermit im Darm gehalten werden ohne eine zelluläre Immunantwort zu generieren (Abreu 2010; Mowat und Agace 2014).

Ihre Barriere-Funktion halten die intestinalen Epithelzellen hauptsächlich durch *tight junctions* aufrecht. Sollen parazellulär Stoffe ausgetauscht werden, so bilden sich hier Poren oder

Lecks. Ist das Epithel geschädigt, z. B. durch Ulzerationen, kann hingegen ein ungehinderter transepithelialer Fluss stattfinden. Experimentell deutet in Mausmodellen mit akuter Colitis vieles daraufhin, dass eine erhöhte parazelluläre Permeabilität die Colitis beschleunigt und eine intakte *tight junction*-Barriere das Fortschreiten der Erkrankung verzögert (Odenwald und Turner 2017). Claudin-Proteine, die Bestandteil der *tight junctions* sind und die parazelluläre Permeabilität differenziell regulieren, können durch Zytokine beeinflusst werden. So führt die Wirkung von  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  und IL-13 auf die Claudine 2, 3 und 4 zu einer erhöhten Permeabilität (Prasad et al. 2005).

Aktuelle Untersuchungen konnten zeigen, dass pro-inflammatorische Zyto- und Chemokine nach einer selektiver Deletion des Glukokortikoid-Rezeptors (GR) in intestinalen Epithelzellen vorübergehend hochreguliert werden. Demnach scheint der GR eine relevante Rolle im Rahmen der Homöostase des Darmepithels zu spielen. Durch die schnelle Kompensation ist die genaue Auswirkung einer dauerhaften Veränderung auf die langfristige Homöostase jedoch noch nicht absehbar (Aranda et al. 2019; Muzzi et al. 2020).

### 1.3 Makrophagen

Der Körper ist tagtäglich mit potenziell pathogenen Mikroorganismen konfrontiert, die versuchen über verschiedene Wege in ihn einzudringen. Eine der ersten Barrieren stellen die Haut und Schleimhäute dar. Im Darm bildet das Epithel eine physikalische Barriere gegen eindringende Pathogene. Als weitere Abwehrlinie schließen sich Zellen des angeborenen Immunsystems an, insbesondere Makrophagen und dendritische Zellen. Als Teil der Immunantwort können sie Pathogene erkennen, unterscheiden und insbesondere über ihre phagozytierenden Eigenschaften eliminieren. Die ortsständigen Makrophagen unterscheiden sich in ihrem Phänotyp von denen anderer Gewebe und derer im Blut zirkulierenden. Es konnte gezeigt werden, dass sich Makrophagen aus zwei verschiedenen Ursprungsgeweben entwickeln. Sie bilden sich entweder aus hämatopoetischen Vorläuferzellen und werden als Monozyten über die Blutbahn zu den immunologischen Organen bzw. in das Zielgewebe transportiert. In das Gewebe wandern sie nur im Rahmen von Immunreaktionen ein und differenzieren sich unter dem Einfluss von Zytokinen zu Makrophagen. Alternativ stammen sie aus embryonalem Gewebe und entwickeln sich während der pränatalen Phase ortsständig in den entsprechenden Geweben (Schulz et al. 2012; Wynn et al. 2013; Epelman et al. 2014).

In der Lamina propria des Darms wurden insbesondere auch CX3C-Chemokinrezeptor-1-exprimierende Makrophagen gefunden, die kurzlebiger sind und im Gegensatz zu den meisten anderen ortsständigen Gewebemakrophagen regelmäßig durchzirkulierende Monozyten aus der Blutstrombahn ersetzt werden. Im gesunden Gewebe entwickeln sie eine nicht-entzündliche Genexpressionssignatur (Zigmond und Jung 2013). Kommen die ortsständigen Makrophagen in Kontakt mit Pathogenen, phagozytieren sie diese, vermitteln daraufhin jedoch keine starken pro-inflammatorischen Immunreaktionen. Diese Toleranz gegenüber der kommensalen Darmflora spielt eine entscheidende Rolle bei der

Aufrechterhaltung der Darmhomöostase. Es wird davon ausgegangen, dass ein Faktor bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen der Verlust dieser Toleranz ist (Heinsbroek und Gordon 2009).

Auf ihrer Oberfläche exprimieren Makrophagen *toll-like*-Rezeptoren, mit denen sie Pathogene, z. B. deren Lipopolysaccharide, erkennen (Martinez et al. 2008). Durch Phagozytose der Pathogene können sie deren Bestandteile nach Beladung auf MHC-II-Moleküle (Haupthistokompatibilitätskomplex, *major histocompatibility complex*) präsentieren und damit das erworbene Immunsystem – im speziellen T-Helfer-Zellen – aktivieren (Perez-Lopez et al. 2016).

### 1.3.1 Klassische und alternative Aktivierung, sowie Effektor-Wirkung

Neben ihrer Funktion als professionelle antigenpräsentierende Zellen und ihrer Rolle bei der Aktivierung des erworbenen Immunsystems können Makrophagen auch auf anderen Wegen aktiviert werden. Dies geschieht insbesondere durch Immunmediatoren und führt zur Ausprägung verschiedener Phänotypen. Man unterscheidet vereinfacht zwischen M1- und M2-Polarisation der Makrophagen. Bei entsprechend verändertem Zytokinmilieu sind diese in der Lage ihren Phänotyp zu wechseln, was als Plastizität bezeichnet wird (Sica und Mantovani 2012; Sica et al. 2015).

M1-Makrophagen entwickeln sich durch klassische Aktivierung nach Kontakt mit Bakterien bzw. ihren PAMPs (pathogen-assoziierte molekulare Muster, *pathogen-associated molecular patterns*), wie z. B. Lipopolysacchariden. Weitere Stimuli sind das von spezifisch aktivierten Th-1-Zellen sezerniertes INF- $\gamma$ , sowie das von antigen-präsentierenden Zellen produzierte Zytokinmilieu, das IL-12 und IL-18 enthält. Intrazellulär hat dies eine Aktivierung der NF- $\kappa$ B-(kappa leichte Ketten verstärkender nuclearer Faktor, *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer*) und STAT1-Signalwege zur Folge. Studien in knockout-Mäusen haben gezeigt, dass diese Signalwege insbesondere für die zelluläre Immunität, aber auch bei Immundefizienz-Erkrankungen wie AIDS (erworbenes Immunschwächesyndrom, *acquired immune deficiency syndrome*) oder Gewebeschäden bei rheumatoider Arthritis eine Rolle spielen (Dalton et al. 1993; Gordon 2003). M1-Makrophagen exprimieren IL-12 und IL-23, sowie TNF- $\alpha$ , die die Differenzierung von Th-1- und Th-17-Zellen vermitteln (Sica und Mantovani 2012). Außerdem sezernieren sie pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , und IL-6, die Enzyme Cyclooxygenase-2 und iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase, *inducible nitric oxide synthase*) sowie kleine Mengen des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. Sie vermitteln über reaktive Sauerstoffspezies die Abtötung eindringender Pathogene oder anti-tumorale gewebeschädigende Abwehrmechanismen. Die Immunreaktion wird durch die anti-inflammatorische Funktion von M2-Makrophagen reguliert (Wynn et al. 2013; Shapouri-Moghaddam et al. 2018).

Die Polarisation in M2-Makrophagen wird auch als alternative Aktivierung bezeichnet und durch die Th-2-Zytokine IL-4 und IL-13 über die Aktivierung von STAT6 durch den IL-4R- $\alpha$  (Interleukin-4-Rezeptor- $\alpha$ ) vermittelt. IL-33 verstärkt die IL-13 induzierte Polarisierung durch Hochregulation von Arginase-1, CCL-(CC-Chemokinligand)-12 und CCL-24. M2-Makrophagen sezernieren anti-inflammatorische Zytokine und Scavenger-Rezeptoren und steuern der Entzündungsreaktion entgegen bzw. helfen nach einer abgelaufenen Entzündungsreaktion, die weitere Immunreaktion zu regulieren. Hierzu tragen unter anderem IL-12 und TGF- $\beta$  bei. Die Produktion von IL-12 wird herunterreguliert. M2-Makrophagen haben eine hohe Phagozytose-Kapazität, fangen Zelltrümmer und apoptotische Zellen ab und induzieren Gewebereparaturmechanismen, wie Narbenbildung, Angiogenese und pro-fibrotische Effekte (Gordon und Martinez 2010; Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Hierzu exprimieren sie in hohem Maße Rezeptoren, wie Scavenger-Rezeptoren, CD163 (Oberflächendifferenzierungsmarker von Zellen, *cluster of differentiation*), Sabinin-1 und c-Typ-Lektin-Rezeptor, CD206, CD301, Dectin-1 und CD209. Desweiteren rekrutieren sie Th-2- und regulatorische T-Zellen, sowie eosinophile und basophile Granulozyten durch Sekretion der Chemokine CCL-12, CCL-18, CCL-22 und CCL-24. Mittlerweile ist bekannt das M2-Makrophagen in weitere Subklassen mit spezifischeren Aktivierungs- und Wirkmechanismen (**Tabelle 1**) unterteilt werden können (Mantovani et al. 2004; Porta et al. 2015; Shapouri-Moghaddam et al. 2018).

**Tabelle 1. Biologische und physiologische Merkmale von M1- und M2-Makrophagen bei Menschen und Mäusen.** Modifiziert nach (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons, Lizenznummer: 5134310862213.

Phäno- typ	Stimuli	Zellexpressions- marker	Zytokine, Chemokine und andere sezernierte Mediatoren	Funktion
M1	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LPS	CD80, CD86, CD68, MHC-II, IL-1R, TLR-2, TLR-4, iNOS, IL-10 niedrig, IL-12 hoch	TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23, IL-27, CXCL-9, CXCL-10, CXCL-11, CXCL-16, CCL-5, Arg-2 (Maus), iNOS (Maus), ROS	pro- inflammatorische Th-1-Antwort, Tumorresistenz
M2a	IL-4, IL-13	Mensch: MMR/CD206, IL1-Ra, IL-1R II Maus: Arg-1, FIZZ1, Ym1/2	IL-10, TGF- $\beta$ , CCL-17, CCL-18, CCL-22, CCL-24	anti- inflammatorisch, Gewebeumbau
M2b	Immunkomplexe, TLR-Ligand, IL-1 $\beta$	IL-10 hoch, IL-12 niedrig, CD86	TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, CCL-1	Th-2-Aktivierung, Immunregulation
M2c	IL-10, TGF- $\beta$ , Glukokortikoide	Mensch: MMR/CD206, TLR-1, TLR-8 Maus: Arg-1	IL-10, TGF- $\beta$ , CCL-16, CCL-18, CXCL-13	Phagozytose von apoptotischen Zellen
M2d	TLR-Ligand, Adenosin-Rezeptor- Liganden	VEGF, IL-12 niedrig, TNF- $\alpha$ niedrig, IL-10 hoch	IL-10, VEGF	Angiogenese, Tumorprogression

CXCL: CXC-Chemokinligand, FIZZ1: Gefunden in Inflammationszone 1; IL1-Ra: IL-1-Rezeptor-Antagonist; iNOS: induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; LPS: Lipopolysaccharide; MHC-II: Haupthistokompatibilitätskomplex; MMR (CD206): Makrophagen-Mannose-Rezeptor; ROS: reaktive Sauerstoffspezies; TLR: *toll-like*-Rezeptor; VEGF: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; Ym1 oder *chitinase-3-like*-Protein-3 (Chi3l3)

### 1.3.2 Makrophagen, Autoimmunität und ihre Rolle im Darm

Autoimmune und chronisch-entzündliche Erkrankungen sind bis heute nur unvollständig verstanden, jedoch wird davon ausgegangen, dass entweder die fehlende Kontrolle oder eine überschießende Immunreaktion Ursache dieser Erkrankungen sind (Wynn et al. 2013). Wie bereits zuvor beschrieben stimulieren die über den klassischen Weg aktivierten Makrophagen (M1) die Immunabwehr, während alternativ aktivierte Makrophagen (M2) typischerweise die Immunreaktion hemmen bzw. unterdrücken und an der Wiederherstellung der Homöostase beteiligt sind.

Makrophagen konnten als relevante Quelle von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-12, IL-18, IL-23 und TNF- $\alpha$  als Treiber von autoimmunen Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose oder chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen identifiziert werden (Wynn et al. 2013). Auch in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) konnte der Einfluss von M1-Makrophagen auf die Progression der Erkrankung bei Mäusen nachgewiesen werden (Jiang et al. 2014). Im Mausmodell fördert eine Untergruppe von *toll-like*-Rezeptor-exprimierenden CC-Motiv-Rezeptor-2-(CCR2)-abhängigen Makrophagen durch Produktion von TNF- $\alpha$  die Entzündung des Colons (Platt et al. 2010). Darüber hinaus können im Dickdarm produzierte Entzündungsmediatoren im Rahmen einer Colitis zur massiven Einwanderung von Monozyten führen, die sich dann pro-inflammatorisch differenzieren und große Mengen an IL-12, IL-23, iNOS und TNF- $\alpha$  produzieren. Das Gleichgewicht dieser einwandernden Zellen zugunsten einer pro- oder anti-inflammatorischen Polarisierung hängt insbesondere von der vorliegenden lokalen Mikroumgebung ab (Rivollier et al. 2012). Die weiter zuvor beschriebene Toleranz von ortsständigen Makrophagen des Darmepithels gegenüber der kommensalen Darmflora scheint auf das Fehlen von angeborenen Reaktionsrezeptoren, wie CD14, und der trotz der phagozytierenden Funktionen fehlenden Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen zurückzuführen zu sein (Smith et al. 2001; Smythies et al. 2005). In der Lamina propria des Darms von an Morbus Crohn Erkrankten wurden große Populationen von Makrophagen gefunden, die CD14 exprimieren und zusätzlich größere Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-23, TNF- $\alpha$  und IL-6 sezernieren; im Gegensatz zu den typischen intestinalen, residenten, CD14-negativen Makrophagen. Diese CD14-positiven Makrophagen tragen zur Produktion von IL-23 und IFN- $\gamma$  durch die mononukleären Zellen der Lamina propria bei, die wiederum eine pro-inflammatorische Makrophagendifferenzierung vermittelt und damit die Immunreaktion weiter antreibt (Kamada et al. 2008). Residente Gewebemakrophagen und rekrutierte Monozyten mit anti-inflammatorischer Polarisierung scheinen grundsätzlich zur Homöostase im Darm durch

Beseitigung von apoptotischen Zellen und Zellfragmenten, der Förderungen der epithelialen Reparaturmechanismen, der antagonistischen Wirkung gegenüber M1-Makrophagen und durch Sekretion von IL-10 zur Differenzierung regulatorischer T-Zellen entscheidend beizutragen (Smith et al. 2009; Wynn et al. 2013). Zusammenfassend ist zu sagen, dass Veränderungen in der Makrophagendifferenzierung, -polarisation, -repolarisation und -aktivierung im lokalen Milieu eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese einer Vielzahl von Autoimmun- und Entzündungskrankheiten, wie auch der Darmhomöostase spielen (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Abschließend ist zu bedenken, dass die Auflösung der intestinalen Entzündung und der anschließend folgenden Regeneration der Mukosa, der entscheidende Schritt in der Remission chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen ist. Die hier dargelegten Probleme in der Polarisation hin zu anti-inflammatorischen Phänotypen und die Erfolge mit Therapien die M2-Makrophagen begünstigen, eröffnen neue Ansatzpunkte für Makrophagen als therapeutische Zielmoleküle (Na et al. 2019).

## 1.4 Glukokortikoide

Glukokortikoide sind Steroidhormone, die eine zentrale Rolle im Stoffwechsel und vor allem in Stresssituationen spielen. Sie steigern den Blutzuckerspiegel, induzieren Glukoneogenese und Lipolyse, erhöhen den Blutdruck und fördern eine katabole Stoffwechsellage. Zudem regulieren sie grundlegende zelluläre Funktionen wie den Zellstoffwechsel, Wachstum, Differenzierung von Zellen und Apoptose und im Rahmen von Entzündungsreaktionen Gewebereparatur, -regeneration und Pathogen-Eliminierung (Strehl et al. 2019).

Die endogene Synthese unterliegt einem hypothalamisch-hypophysärem Regelkreislauf (Hypothalamus-Hypophysen-Achse), der die Sekretion streng reguliert und zirkadianen Schwankungen unterliegt. Damit erzeugen Glukokortikoide eine Verbindung zwischen dem endokrinen System und dem Immunsystem. Im klinischen Alltag finden synthetische Glukokortikoide mannigfaltige Anwendung im Kontext verschiedenster Erkrankungen (Young et al. 2004).

Glukokortikoide wirken insbesondere über genomische aber auch schnellere nicht-genomische Wege, sowohl entzündungshemmend als auch in gewissem Maße immunsuppressiv. Daher werden synthetische Glukokortikoide regelhaft zur Therapie bei Allergien, entzündlichen Erkrankungen wie Asthma, Infektionen, Multipler Sklerose, rheumatischen Erkrankungen, Vaskulitiden, sowie Autoimmunerkrankungen und vielen weiteren Erkrankungen eingesetzt (Kadmiel und Cidlowski 2013; Cruz-Topete und Cidlowski 2015). Neben der Wirkung auf Entzündungen und das Immunsystem haben sie anti-proliferative, anti-angiogene und zum Teil apoptotische Wirkungen auf Gewebe (Vilasco et al. 2011). Dabei sind die insbesondere bei langfristiger Gabe auftretenden Nebenwirkungen von Glukokortikoiden nicht zu unterschätzen. So können sie mit schweren und teilweise nicht reversiblen Nebenwirkungen, wie Osteoporose, Hautatrophie,

peptischen Ulcera, Cushing-Syndrom, Diabetes mellitus und Glaukomen einhergehen (Schäcke et al. 2002; Schäcke et al. 2004).

Der Großteil der systemisch wirksamen endogenen Glukokortikoide wird in der Nebennierenrinde synthetisiert, es gibt jedoch auch weitere Endorgane die lokal wirksame Glukokortikoide sezernieren können. Insbesondere bei intestinalen Entzündungsreaktionen gibt es Hinweise, dass die lokale Synthese von Glukokortikoiden im Darm einen wichtigen Regulator darstellt, der jedoch einer anderen Regulierung als die adrenale Synthese unterliegt und vor allem durch lokale Entzündungsmediatoren induziert wird. (Taves et al. 2011; Bouguen et al. 2015). Die genauen Mechanismen sind aber noch unzureichend verstanden.

In Bezug auf die Rolle endogener und exogener Glukokortikoide bei chronischen-entzündlichen Erkrankungen werden vor allem folgende Gesichtspunkte diskutiert: die inadäquat niedrige Produktion von endogenem Cortisol im Verhältnis zur systemischen Entzündung (das Disproportionsprinzip); die Veränderungen des systemischen und lokalen Cortisol-Cortison-Shuttles (Reaktivierung und Abbau von Cortisol); die Glukokortikoid-Resistenz; Veränderungen in der gegenwärtigen Glukokortikoid-Therapie; und die Rolle der zirkadianen Rhythmen bei der Wirkung von Cortisol (Straub und Cutolo 2016). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Körper im Rahmen von chronischen Entzündungen in der Lage ist die Umwandlung von inaktivem Cortison in Cortisol durch die *11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1* hochzuregulieren. Die Expression des Enzyms wird durch TNF- $\alpha$  erhöht und ist damit ein autokriner Schutzmechanismus am Entzündungsort (Jostins et al. 2012).

#### 1.4.1 Der Glukokortikoid-Rezeptor und seine Funktionalität

Der GR, der zur nukleären Rezeptorsuperfamilie gehört, wird ubiquitär exprimiert und vermittelt einen Großteil der Effekte von Glukokortikoiden (Tuckermann et al. 2005). Diese wirken nach Bindung an den GR, indem sie mit speziellen Erkennungssequenzen in der DNA (Desoxyribonukleinsäure, *desoxyribonucleic acid*) interagieren und Gene regulieren. Somit ist der GR ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, der die Genexpression sowohl positiv als auch negativ beeinflussen kann (Whitfield et al. 1999; Escoter-Torres et al. 2019). 1000 bis 2000 Gene konnten bislang identifiziert werden, die auf Glukokortikoide reagieren. Darunter sind auch viele Gene, die für Aspekte der Immunreaktion und Entzündungen kodieren (Straub und Cutolo 2016). In Immunzellen, wie neutrophilen Granulozyten oder Makrophagen, wird die Expression und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen gehemmt, die typisch für eine M1-Polarisation sind. Dies zeigt sich auch durch die Anfälligkeit von Mäusen mit einer Deletion des GR in myeloischen Zellen für eine Sepsis oder ein akutes Lungenversagen (Kleiman et al. 2012; Vettorazzi et al. 2015). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Glukokortikoide die Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen und Scavenger-Rezeptoren induzieren. Diese vermitteln unter anderem eine M2-Polarisation der Makrophagen, die wiederum zu einer Beendigung der



Entzündungsreaktion beiträgt (Schweingruber et al. 2011). Somit bewirken Glukokortikoide eine Repolarisation von Makrophagen vom M1- zum M2-Phänotyp.

Der GR ist in drei Hauptdomänen organisiert: eine N-terminale-Domäne, eine zentrale DNA-Bindungsdomäne und eine C-terminale Ligandenbindungsdomäne. Neben der Ligandenerkennung enthält letztere eine ligandenabhängige Aktivierungsfunktion (AF-2), die durch die Hormonbindung reguliert wird (Bledsoe et al. 2002; Vandevyver et al. 2013). Der Rezeptor liegt in Cytoplasma gebunden an Chaperone, wie Hitzeschockproteine (HSP 90, 70, 56) und Immunophilin vor (Pratt 1993; Smith und Toft 1993; Pratt und Toft 1997). Die Bindung von Glukokortikoiden geschieht im Zytoplasma, die Chaperone dissoziieren vom GR, durch eine Konformationsänderung werden die Kernlokalisierungssequenzen freigelegt (Picard und Yamamoto 1987) und gebunden an das Chaperon Importin tritt der GR in den Zellkern ein (Freedman und Yamamoto 2004). Dort vermittelt er seine Wirkung auf die Genexpression über zwei verschiedene Mechanismen – die Transaktivierung und die Transrepression. Die Transaktivierung umfasst die Dimerisierung des GR und die folgende Bindung an palindromische Sequenzen, sogenannte *glucocorticoid-responsive*-Elemente, die sich in Promotorregionen von Genen befinden (Schmid et al. 1989). Der entstehende Komplex rekrutiert Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren, die die Struktur des Chromatin modifizieren und damit die Transkription durch die RNA-( Ribonukleinsäure, *ribonucleic acid*)-Polymerase II erleichtern oder hemmen (Beato und Sánchez-Pacheco 1996; Hebbard und Archer 2003; Rhen und Cidlowski 2005). Auf diese Weise kommt es unter anderem auch zur Transkription entzündungshemmender Mediatoren, wie Annexin-1 und des Inhibitors des Nuklearfaktors- $\kappa$ B ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ), sowie zur Repression diverser Interleukinen, wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  (D'Adamio et al. 1997; McKay und Cidlowski 1999; Deroo und Archer 2001). Für die Dimerisierung am GR benötigt dieser in der DNA-Bindungsdomäne die als Zinkfinger bezeichneten Bereiche. Diese bestehen aus zwei Zink-Ionen, die mit Cystein zwei Peptid--Schleifen bilden (Luisi et al. 1991).

Die Transrepression oder auch *tethering mechanism* beschreibt die Wirkung des GR unabhängig von der Bildung eines Homodimers (Reichardt et al. 2001). Stattdessen beeinflusst der GR-Ligandenkomplex die Transkription durch seine Bindung und Hemmung pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B, CREB (*cAMP, cyclic adenosinmonophosphat- response element-binding protein*), IRF3 (*interferon regulatory factor 3*), NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), STAT oder AP-1 (*activating protein*). Die als typische Zielgene vor allem pro-inflammatorischer Proteine, wie IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, Cyclooxygenase-2, iNOS, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , adressieren. (De Bosscher und Haegeman 2009). Zudem wird durch Rekrutierung der Histon-Deacetylasen die Histonkondensation initiiert, dies führt zu einer reduzierten Genexpression von Inflammationsmediatoren wie Zyto- und Chemokinen (Barnes 2011).

Glukokortikoide und der GR wirken auch über einen weitere – nicht-genomische – Mechanismen. Diese Wirkungen erreichen sie über die Modulation von zytosolischen

Signalwegen (Rhen und Cidlowski 2005), indem sie unter anderem MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), AC (*adenylyl cyclase*), PKC (*protein kinase c*) und G-Proteine (*guanosine triphosphat-binding proteins*) aktivieren (Cato et al. 2002) beziehungsweise direkt auf Signaltransduktoren wie NF- $\kappa$ B (Widén et al. 2003), MAP (Ayroldi et al. 2012) oder PI3-Kinasen (Limbourg et al. 2002) wirken. Diese Effekte können sie im Gegensatz zum genomischen Mechanismus der 30 – 60 min in Anspruch nimmt, auch in Sekunden bis wenigen Minuten vermitteln (Cato et al. 2002).

#### 1.4.2 Wirkung von Glukokortikoiden auf Makrophagen

Glukokortikoide haben eine Vielzahl von Wirkungen auf Makrophagen. So konnte gezeigt werden, dass hierdurch ihr Zellwachstum und die Proteinsynthese gehemmt wird (Norton und Munck 1980). Schaffner (1985) wies außerdem nach, dass die antimikrobielle Aktivität von Makrophagen durch Glukokortikoide deutlich unterdrückt wird. Auch die Synthese von Entzündungsmediatoren wie pro-inflammatorischen Interleukinen (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12), TNF- $\alpha$ , sowie iNOS und Stickstoffmonoxid wird von Glukokortikoiden gehemmt (Almawi et al. 1996; Kleinert et al. 1996; Joyce et al. 1997; Tuckermann et al. 2005). Später konnte bestätigt werden, dass die Expression und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen gehemmt werden, die typisch für eine M1-Polarisation sind. Mäuse mit einer Deletion des GR in myeloischen Zellen waren besonders anfällig für eine Sepsis oder ein akutes Lungenversagen (Kleiman et al. 2012; Vettorazzi et al. 2015). Auch die Hemmung der phagozytischen Aktivität von Makrophagen durch Glukokortikoide konnte kürzlich im Mausmodell erneut nachgewiesen werden. Der Schweregrad von bakteriellen Infektionen war infolge dessen in einer Untersuchung erhöht (Xie et al. 2021). Endogene Glukokortikoide beeinflussten die Reaktion von ortsständigen Makrophagen der Lunge und hemmten insbesondere ihre Phagozytoseaktivität, wenn diese O<sub>3</sub> (Ozon) ausgesetzt wurden (Thomas et al. 2021).

In einer Arbeit mit liposomalen Glukokortikoiden, die zur Therapie einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) eingesetzt wurden, induzierten diese die Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen und Scavenger-Rezeptoren. Hierdurch wurde unter anderem eine M2-Polarisation der Makrophagen ausgelöst, die wiederum zur Beendigung der Entzündungsreaktion beitrug (Schweingruber et al. 2011). Glukokortikoide schützen zudem vor einem TNF-induziertem tödlichen Schock und TNF-induzierter intestinaler Permeabilität (Van Hauwermeiren et al. 2015). Glukokortikoide sind außerdem in der Lage TNF- $\alpha$  vermittelte Entzündungssymptome zu reduzieren. Die TNF-induzierte akute tödliche Entzündung ist ein interessantes Mausmodell, bei dem intestinale Epithelzellen als Hauptzielzellen von TNF beschrieben wurden (Huys et al. 2009; Van Hauwermeiren et al. 2015). Mäuse mit beeinträchtigter Transkription von GR-Dimer-abhängigen Zielgenen (GR<sup>dim/dim</sup>) zeigten eine deutliche Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber TNF- $\alpha$  und einen fehlenden anti-inflammatorischen Schutz durch Glukokortikoide. Biochemisch zeigte sich eine Interferon-stimulierte Gensignatur und die Hochregulation von STAT-1. Die

Veränderungen führten zu einer ausbleibenden Repression der Inflammationsmediatoren und einer übermäßigen Nekroptose-Induktion im Darm (Ballegeer et al. 2018). Intestinale Epithelzellen sind in der Lage endogene Glukokortikoide zu produzieren. Bleibt diese intestinale Glukokortikoid-Synthese aus, führt dies zu einer verstärkten Aktivierung intestinaler antigenspezifischer T-Zellen, was die immunsuppressive Rolle der lokal produzierten intestinalen Glukokortikoide bestätigt (Cima et al. 2004). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Induktion der intestinalen Glukokortikoid-Synthese von Makrophagen-Effektor-Funktionen abhängig war und der Mangel an Makrophagen im Gewebe die intestinale Glukokortikoid-Synthese hemmte. Das Fehlen von T- und B-Zellen hatte hingegen keinen Einfluss (Noti et al. 2010). Können Makrophagen nicht auf IL-10 – ein entzündungshemmendes Zytokin, das den M2-Phänotyp induziert – reagieren, führte dies zu einer schweren Colitis (Zigmond et al. 2014). In Entzündungen phagozytieren Makrophagen apoptotische und nekrotische Zellen (M1-Phänotyp) und waren an der Gewebereparatur und Entzündungsregulation beteiligt (M2-Phänotyp), indem sie ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Effekten herstellen, das unter anderem durch die Wirkung endogener Glukokortikoide beeinflusst wird (Diaz-Jimenez et al. 2021).

Makrophagen und endogene Glukokortikoide wirken damit in einem engen Zusammenspiel und sind insbesondere in ihrer Interaktion hoch relevant für das Aufrechterhalten der Darmhomöostase.

## 1.5 Tierversuche

Tierversuche stellen bis heute in der biomedizinischen Forschung eine notwendige Methode dar. Trotz umfangreicher alternativer Methoden, wie z. B. Zellkulturen, die in der Breite und komplementär angewendet werden, können insbesondere Forschungsvorhaben zu komplexen Prozessen und vielfältigen Interaktionen innerhalb eines intakten Organismus nur unvollständig ohne Tierversuche verstanden werden. Gerade grundlegende Prozesse und Pathomechanismen des Immunsystems bedürfen häufig eines solchen Systems.

Um trotz dessen dem Tierwohl gerecht zu werden findet im Vorfeld jedes Tierversuches die Prüfung durch eine Tierschutzkommission statt, die insbesondere auch das von W. Russell und R. Burch bereits 1959 formulierte 3R-Prinzip berücksichtigt: Die DFG fasst darunter das Ziel, „Tierversuche wenn möglich zu vermeiden (*refinement*), die Zahl zu reduzieren (*reduction*) und das Leid der Tiere in Versuchen auf das Unerlässliche zu beschränken (*replacement*)“ (Exner et al. 2016).

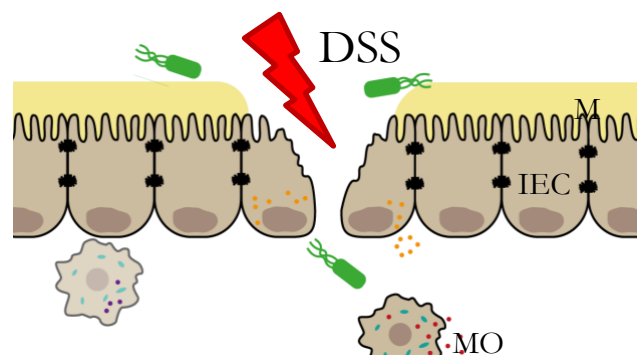
Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Tierversuche wurden durch das Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit geprüft und genehmigt (Az: 33.9-42502-04-12/0937).

### 1.5.1 DSS-induzierte Colitis als Krankheitsmodell für die Colitis Ulcerosa

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen sind sehr heterogen und weisen verschiedene phänotypischen Subtypen mit unterschiedlicher klinischer Erscheinung auf, die jeweils ihre multifaktoriellen Ursachen widerspiegeln. Dementsprechend existieren viele experimentelle Modelle für Entzündungen oder chronisch-entzündliche Erkrankungen des Darms. Neben transgenen und gentechnisch modifizierten Mauslinien, die ähnliche Darmveränderungen wie in den entsprechenden humanen Erkrankungen aufweisen, gibt es die am häufigsten verwendeten chemisch induzierten Modelle der Darmentzündung (Perše und Cerar 2012). Ein Vorteil gegenüber transgenen Modellen ist die einfache Induktion und die Möglichkeit immunkompetente Tiere aufwachsen zu lassen und zu einem gezielten Zeitpunkt die Erkrankung zu induzieren. Des Weiteren fallen Faktoren unterschiedlicher Entwicklung, wie Variabilität und Penetranz die in einigen angeborenen Modellen zu beobachten sind, weg (Wirtz et al. 2017).

Ein gut etabliertes Modell, um die Rolle des angeborenen Immunsystems bei akuten intestinalen Entzündungen zu untersuchen, ist die Behandlung von Mäusen mit DSS. DSS schädigt die Dickdarmschleimhaut (Abbildung 2) und führt zu einer schweren Colitis, die mit einem Gewichtsverlust, blutigen Diarrhoen, einem Epithelzellverlust und der Infiltrationen mit neutrophilen Granulozyten und Makrophagen einhergeht. Damit ähnelt es in einigen Merkmalen den Schüben der humanen Colitis Ulcerosa (Okayasu et al. 1990). Die Epithelverletzung zerstört die Barriere-Funktion der Mukosa und setzt die Immunzellen den bakteriellen Antigenen des Darmes aus, wodurch

eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Insbesondere Auswirkungen des intestinalen Mikrobioms, weiterer Umweltfaktoren, wie die Ernährung, aber auch grundlegende Veränderungen des Immunsystems bzw. dessen Effektor-Zellen können so unabhängig von einer genetischen Prädispositionen untersucht werden (Hudcovic et al. 2001; Hernández-Chirlaque et al. 2016). Durch Absetzen des auslösenden Agens ist es möglich die Krankheitsursache aufzuheben und damit auch die Regeneration zu untersuchen. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch lymphopenische Mäuse mit schwerer kombinierter Immunschwäche (SCID) in der Lage sind eine akute DSS-induzierte Colitis zu entwickeln, womit die Entzündungsreaktion keiner adaptiven Immunzellen bedarf (Dieleman et al.



**Abbildung 2. Induktion der Colitis durch DSS**

Wird die Darmbarriere bestehend aus Schleimschicht (Mucus - M), Intestinalen Epithelzellen (IEC) und Immunzellen der Lamina propria, wie Makrophagen (MO) zerstört, können Mikroorganismen durch die Darmbarriere dringen. Sowohl intestinale Epithelzellen als auch Makrophagen sezernieren Immunmediatoren. DSS (Dextranansulfat) führt zu einer Schädigung der Darmbarriere und damit zu einer intestinalen Entzündungsreaktion. Einerseits durch die Noxe selbst, andererseits durch eindringende Mikrobiota. modifiziert nach (Coskun 2014) (CC BY)

1994). Damit ist sie ein gut geeignetes Modell, um angeborene Immunmechanismen im Zusammenhang mit der Colitis und der anschließenden Gewebereparatur zu analysieren (Wirtz et al. 2017).

### 1.5.2 Transgene Mauslinien

In dieser Arbeit wurden als Versuchstiere Mäuse mit genetischen Veränderungen verwendet. Durch gezielte Mutation des Zielgens in embryonalen Stammzellen mittels homologer Rekombination wurden an bestimmten Loci Gene zielgerichtet eingefügt bzw. verändert.

#### 1.5.2.1 GR<sup>lysM</sup> – eine Kreuzung aus GR<sup>lox</sup> & LysMCre

Die in dieser Arbeit als GR<sup>lysM</sup> bezeichnete Mauslinie ist eine Kreuzung über mindestens 6 Generationen der im Folgenden beschriebenen GR<sup>lox</sup> und LysMCre-Linien. Unter der eingeführten Mutationskombination fehlt der GR in den Zellen der myeloiden Reihe fast vollständig. Makrophagen und neutrophile Granulozyten zeigen somit kein Ansprechen auf die als Ligand des GR vermittelte Wirkung von Glukokortikoiden (Wüst et al. 2008). Der ursprünglich verwendete Hintergrund ist C57Bl/6, in dieser Arbeit wurde zudem eine Rückkreuzung auf den Balb/C-Hintergrund verwandt (Tuckermann et al. 2007).

Die komplette Inaktivierung des GR führt bei der Geburt zu nicht lebensfähigen Individuen. Mittels gewebespezifischer Mutation und damit dem Verlust der GR-Funktion ausschließlich in ausgewählten Geweben entwickeln sich lebensfähige adulte Mäuse. Dies wurde mit Hilfe des vom Bakteriophagen P1 abgeleiteten Cre/loxP-Rekombinationssystems erreicht. Durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen wurde ein modifiziertes GR-Allel erzeugt. Das für den ersten Zinkfinger der GR-DNA-Bindungsdomäne kodierende Exon 3 wird von loxP-Stellen flankiert. Trotz dessen wird zunächst ein aktives Endprodukt kodiert. Mäuse mit homozygot verändertem GR-loxP-Locus entwickeln sich normal und haben eine mit Wildtyp-Mäusen identische Expression des GR. Das Allel ist jedoch gegenüber der Cre-Rekombinase empfindlich, die an die loxP-Stelle bindet und die dazwischen liegende DNA-Sequenz entfernt. Somit kann der GR in jeder Zelle, die die Cre-Rekombinase exprimiert inaktiviert werden. Diese Mauslinie wurde als GR<sup>lox</sup> bezeichnet (Tronche et al. 1999).

Die LysMCre-Mauslinie ist eine Linie, die in myeloischen Zellen die Cre-Rekombinase exprimiert. Hierzu wurde durch gezielte Insertion die Cre-Rekombinase-DNA in den endogenen M-Lysozym-Lokus eingeführt. Das M-Lysozym wird insbesondere von ausgereiften Makrophagen in großem Maße exprimiert, in geringerem Maße auch durch die Vorläuferzellen (Cross et al. 1988). In Kombination mit einer Linie mit loxP-flankierten Zielgenen konnte eine Deletionseffizienz von 83 – 98 % in reifen Makrophagen und nahezu 100 % in neutrophilen Granulozyten festgestellt werden. Andere Gewebe zeigten hingegen keine signifikante Deletion. Damit sind LysMCre-Mäuse eine spezifische und sehr gut

funktionierende Möglichkeit für die Cre-vermittelte Deletion in loxP-flankierten Zielgenen in myeloischen Zellen (Clausen et al. 1999).

Eine spätere Arbeit zeigte für die GR<sup>lysM</sup>-Mauslinie eine hohe Rekombinationseffizienz in den myeloischen Zellen. In mehr als 90 % der neutrophilen Granulozyten und 70 % der Makrophagen konnte eine fast vollständige Deletion des loxP-flankierten GR erreicht werden, während dies in Langerhans-Zellen (43 %), dendritischen Zellen (16 %) und Mastzellen weit weniger effektiv war (Tuckermann et al. 2007).

### 1.5.2.2 Mausstämme mit C57Bl/6 und Balb/C-Hintergrund

Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die beiden Mausstämme C57/Bl6 und Balb/C eine unterschiedliche Prädisposition bezüglich ihrer Immunreaktion durch Th-Zellen aufweisen. So überwiegt in Balb/C-Mäusen die Th-2-Zell vermittelte humorale Immunität, in C57/Bl6-Mäusen hingegen die Th1-Zell vermittelte zelluläre Immunität. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass die Produktion von IL-10 und TNF- $\alpha$  in Balb/C-Mäusen höher ist, die IL-6-Expression sich zwischen den Stämmen jedoch nicht unterscheidet (Yagi et al. 2006; Trunova et al. 2011).

## 1.6 Hypothese und Zielsetzung

In Anbetracht des noch unvollständig verstandenen Pathomechanismus der Colitis Ulcerosa und der guten klinischen Wirkung von Glukokortikoiden stellte sich die Frage, welche Rolle diese im Rahmen der Krankheitsentwicklung und der Remission spielen, um so in Zukunft spezifischere und zielgerichtetere Therapien mit einem verbesserten Nebenwirkungsprofil entwickeln zu können. Daten zur Reaktion der an der Pathogenese beteiligten Zellgruppen auf Glukokortikoide liegen nur unzureichend vor. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle des GR in Makrophagen in einem Tiermodell für Colitis Ulcerosa zu untersuchen.

Makrophagen bilden eine der ersten Abwehrbarrieren im Darm. Sie können spezifisch auf lokale Signale reagieren und ebenso pro- wie anti-inflammatorische Effekte vermitteln. Ihre Toleranz und entzündungshemmende Eigenschaften stellen wichtige Punkt im Rahmen der Remission der Entzündung dar, wobei die Dysbalance zwischen ihren unterschiedlichen Polarisierungen für eine fortbestehende Krankheitsaktivität ursächlich sein könnte. Die untersuchte GR<sup>lysM</sup>-Mauslinie besitzt eine Deletion des GR in myeloiden Zellen, sodass eine Regulation dieser Zellen durch Glukokortikoide ausbleibt. Entsprechend der anti-inflammatorischen Wirkung auf Makrophagen und der Polarisation zum M2-Phänotyp wurde eine geringe Krankheitsaktivität bzw. schnellere Remission in der Vergleichsgruppe erwartet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die akute DSS-induzierte Colitis als Modell verwendet, um den Krankheitsverlauf in Abwesenheit der endogenen Glukokortikoid-Wirkung in myeloiden Zellen zu beurteilen. Untersucht wurde die klinische Präsentation der Mäuse im Rahmen der akuten Colitis zur Einschätzung des Erkrankungsmaßes und der Remission nach Beendigung der Noxe. Weiterhin wurden histopathologische Kriterien im

---

Hinblick auf die Entzündung im Darm beurteilt und molekulardiagnostische Methoden zur Bestimmung des Zytokinmilieus bzw. Genexpression im Darm und Blut zur Einordnung auf molekularer Ebene eingesetzt. Auf diese Weise dient die vorliegende Arbeit dazu, die Rolle der endogenen Glukokortikoid-Wirkung in myeloiden Zellen für die Progression und Remission einer Colitis zu definieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Instrumente

Tabelle 2. Geräte und Instrumente

Bezeichnung	Hersteller
7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Einbettmaschine – Tissue Embedding System EG1160	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Elektrophorese-Netzgerät – Amersham Biosciences Electrophoresis power supply 301	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Gewebehomogenisierer – T18 basic Ultra-Turrax	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Gewebeinfiltrator – Leica TP1020 Tissue Processor	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Laborwaage – TE313S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Magnetrührwerk – VARIOMAG® Power direct magnetic stirrer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikropipetten 2 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, Middleton, USA
Mikroskop – Leica Axio Scope A1	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom – Leica SM2000R	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle R-212	Sharp, Osaka, Japan
Plattenwascher – Nunc-Immuno Wash 12	Nunc, Roskilde, Dänemark
Thermocycler – PCR-Mastercycler EP Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter 766 calimatic	Knick, Berlin, Deutschland
Plattenleser – BioTek Power Wave	BioTek, Friedrichshall, Deutschland
Reinstwassersystem – Arium 611	Sartorius, Göttingen, Deutschland



Schütteltisch – GFL-3006	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Spektrophotometer – Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tiefkühlschrank – HeraFreeze HFU 686 Basic, -86 °C	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tiefkühlschrank Liebherr Comfort -20 °C	Liebherr International, Biberach an der Riss, Deutschland
Vibrationsmischer – Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge – Rotilabo-mini	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge 2-5	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Deutschland
Zentrifuge 5417R für <i>reaction tubes</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5804R für <i>falcon tubes</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 2.1.2 Labormaterialien

Tabelle 3. Labormaterialien

Bezeichnung	Hersteller
diverse Glasgeräte	Schott, Mainz, Deutschland
Einbettungskassetten – <i>tissue cassettes macroflow</i>	Microm International, Waldorf, Deutschland
Immunassayplatte – Nunc-Immuno MicroWell 96 well-Platte, fest, flacher Boden	eBioscience, San Diego, USA
Kanüle – Sterican 26Gx1/2“	B Braun, Melsungen, Deutschland
MicroAmp Optische Klebefilm Abdeckung	Applied Biosystems, Foster City, USA
Nitril-NextGen-Einmalhandschuhe	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
Pasteur Pipette Labsolute 3 ml	Th. Geyer, Renningen, Deutschland
PCR-Platte – Sapphire Microplatte 96 well for PCR	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäß „Multiply-µStrip Pro“	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Pipetten – CELLSTAR serological pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Rundbodenröhrchen (5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serumröhrchen – BD Microtainer SST Gefäße	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Spritze – BD Discardit II 2 ml, 5 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen – Falcon 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4. Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Chloroform (Trichlormethan)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DAB (3,3'-Diaminobenzidin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DEPC (Diethyldicarbonat)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid) > 99,8 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
dNTP's (Desoxyribonukleosidtriphosphate)	Genaxxon bioscience, Ulm, Deutschland
DSS (Dextransodiumsulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Entellan (Eindeckmittel)	Merck, Darmstadt, Deutschland
EnVision Flex Target Retrieval Solution; hoher oder niedriger pH	Dako, Santa Clara, USA
Eosin G (Farbstoff)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 100 % p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol > 99,8 % p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Ethanol 70 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid-Lösung 1 % in H <sub>2</sub> O	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FCS (fetales Kälberserum, <i>fetal calf serum</i> )	Invitrogen, Carlsbad, USA
Gene Ruler 1 kb, DNA ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun-Lösung nach Mayer	Merck, Darmstadt, Deutschland
HF-Puffer (5X Phusion HF-Puffer)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HRP ( <i>horseradishperoxidase</i> )	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat (NaCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
OrangeG (Farbstoff)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Paraffin (Roti-Plast Paraffin für Histology)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
peqGOLD Universal Agarose	Peqlab Biotechnology, Erlangen Deutschland
PFA 4 % pH 7 (Paraformaldehyd)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PfuS (DNA-Polymerase)	aus eigener Herstellung
POWER SYBR Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Qiazol Lysis Reagent	QIAGEN, Hilden Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) 95 - 98 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Streptavidin-Peroxidase (Sigma E 2886)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

## 2.1.4 Kommerzielle Kits

Tabelle 5. kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller
Hemocare-Test	hemocare, Care Diagnostica, Voerde, Deutschland
Qiagen RNeasy® Plus Universal Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Dynabeads mRNA DIRECT Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
ELISA MAX Standard Set Mouse IL-6	BioLegend, San Diego, USA

## 2.1.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 6. Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Ansatz und Herstellung
Agarose-Gel	1 % Agarose in TAE-Puffer, mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid
DAB-Lösung	Stammlösung: 2 g DAB-Pulver auf 80 ml PBS Gebrauchslösung: 1 ml der Stammlösung auf 50 ml mit PBS verdünnen, 20 µl 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> zugeben (entspr. 50 mg/100 ml)
DEPC-Wasser	0,1 % DEPC in dest. H <sub>2</sub> O
DSS-Lösung	20 g Dextrannatriumsulfat in 1 l Leitungswasser, gekühlt gelagert
ELISA <i>assay diluent</i>	10 % FCS in PBS
ELISA <i>coating buffer</i>	8,4 g NaHCO <sub>3</sub> , 3,56 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 1000 ml dest. H <sub>2</sub> O auf pH 6,5 einstellen (entspricht 0,1 M Natriumcarbonat)
ELISA <i>coating buffer</i>	11,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 16,1 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 1000 ml dest. H <sub>2</sub> O auf pH 6,5 einstellen
ELISA <i>developing solution</i>	<i>substrate buffer</i> durch 1 % TMB in DMSO und 0,2 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ergänzen
ELISA <i>substrate buffer</i>	0,1 M Zitronensäure, 0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in dest. H <sub>2</sub> O

Orange G-Lösung	100 mg OrangeG in 30 % Glycerin
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 $\mu$ M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> auf pH 7,4 einstellen
Peroxidase-Block	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in PBS
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer 40 mM TRIS, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA
Citrat-Puffer	Stammlösung: 21 g Zitronensäure auf 1 l dest. H <sub>2</sub> O, mit 10 M NaOH auf pH 6 einstellen  Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 mit dest. H <sub>2</sub> O verdünnen, erneut auf pH 6 einstellen

### 2.1.6 Antikörper und Primer

Die verwendeten Primer wurden durch metabion international, Planegg, Deutschland individuell hergestellt.

Tabelle 7. Primer

<i>Arg1</i>	<i>forward</i>	5' AGCCCGAGCACATGCAGCAG	3'
	<i>reward</i>	5' ACCCCTCCTCGAGGCTGTCCT	3'
<i>Cd163</i>	<i>forward</i>	5' TGG TCC AGG AAC TGG GCC CA	3'
	<i>reward</i>	5' GGG TGG GGT GAC CTG TGC CA	3'
<i>Cd206</i>	<i>forward</i>	5' ATT ATT CCA AAG GCC CGA AG	3'
	<i>reward</i>	5' TCC GAA ATG TTG AAG GGA AG	3'
<i>F480</i>	<i>forward</i>	5' ACC CTC CAG CAC ATC CAT CCA A	3'
	<i>reward</i>	5' TCA CAG CCC GAG GGT GTC CA	3'
<i>Hprt</i>	<i>forward</i>	5' GTC CTG TGG CCA TCT GCC TA	3'
	<i>reward</i>	5' GGG ACG CAG CAA CTG ACA TT	3'
<i>Il1b</i>	<i>forward</i>	5' CTC ATC TGG GAT CCT CTC CA	3'
	<i>reward</i>	5' AAG CAG CCC TTC ATC TTT TG	3'
<i>Il6</i>	<i>forward</i>	5' AGT TGC CTT GGG ACT GA	3'
	<i>reward</i>	5' CAG AAT TGC CAT TGC ACA AC	3'
<i>Il10</i>	<i>forward</i>	5' AGG CAG AGA AGC ATG GCC CAG	3'
	<i>reward</i>	5' CGG GAG AAA TCG ATG ACA GCG CC 3'	

<i>Inos</i>	<i>forward</i>	5' TCA CCT TCG AGG GCA GCC GA	3'
	<i>reward</i>	5' TCC GTG GCA AAG CGA GCC AG	3'
<i>Tnfa</i>	<i>forward</i>	5' CTT GGT GGT TTG CTA GGA CG	3'
	<i>reward</i>	5' ATG GCC TCC CTC TCA TCA GT	3'

Für immunhistochemische Färbungen wurden folgende Antikörper verwendet:

**Tabelle 8. Antikörper für Immunhistochemie**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
rabbit anti-rat-IgG (Biotin), mouse adsorbed, biotinylated (#4001)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
rabbit anti-mouse/rat-IgG-CD68 antibody (#ab213363)	Abcam, Cambridge, Großbritannien
anti-mouse/rat/human-IgG-CD3 Antikörper (#sc-20047)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
rat anti-mouse-IgG Ly-6G and Ly-6C (anti-GR1) (#AB_393586)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-mouse/rat/human-IgG GR/NR3C1 (#sc-393232)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
polymere sekundäre Antikörper gekoppelt an HRP (ImmPRESS HRP Polymer Detection Kit)	Vector Laboratories, Burlingame, USA

### 2.1.7 Software

**Tabelle 9. Software**

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
Microsoft Office, Excel für Mac (2021)	Microsoft Corporation Redmond, USA
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
7500 System SDS Software Version 1.4.0.25	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BioTek Gen5 Version 1.09.08	BioTek, Friedrichshall, Deutschland
GraphPad Prism Version 5.0.4	GraphPad Software Inc., San Diego, USA

## 2.2 Tierversuche mit Mäusen als Modellorganismen

Alle Tierversuche wurden nach den Richtlinien der internationalen Tierschutzvorgaben (Kilkenny et al. 2010) und den nationalen Tierschutzgesetzen durchgeführt. Der Tierversuch wurde durch die Tierschutzkommission geprüft und von der zuständigen Behörde genehmigt (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; Az: 33.9-42502-04-12/0937).

Die Haltung der Mäuse erfolgte in individuell ventilierten Käfigen unter spezifisch-keimfreien Bedingungen (IVC) in der Zentralen Tierexperimentellen Einheit der UMG. Die Mäuse wurden in einem Alter von 8 bis 12 Wochen in die Versuche eingeschlossen. Die Gruppen für die Versuche wurden nach Möglichkeit zu gleichen Teilen aus weiblichen und männlichen Individuen zusammengestellt und paritätisch in Bezug auf Wildtyp- und Mutations-Linie aufgeteilt. Die Mäuse wurden sofern möglich in Gruppen gehalten. Vereinzelt mussten männliche Tiere aufgrund von Aggressivität gegenüber Individuen anderer Würfe in Einzelhaltung untergebracht werden. Trinkwasser und pelletiertes Futter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) standen den Mäusen jederzeit unbegrenzt zur Verfügung. Im Rahmen der Versuche wurde bei ausgeprägten Symptomen der akuten Colitis das Futter zur besseren Aufnahme mit Trinkwasser angefeuchtet und aufgequollen. Die Käfige wurden mit Einstreu ausgelegt, regelmäßig gesäubert und erneuert. Innerhalb der Tierversuchsanstalt herrschte ein standardisierter 12/12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus. Die Identifikation der einzelnen Individuen erfolgte entsprechend dem vor Ort üblichen Ohrlochschemas.

### 2.2.1 Verwendete Mauslinien

Die in dieser Arbeit als GR<sup>lysM</sup> bezeichnete Mauslinie ist eine Kreuzung zwischen der GR<sup>fllox</sup> und LysMCre-Linie. Unter der eingeführten Mutationskombination fehlt der GR in den Zellen der myeloiden Reihe fast vollständig. Makrophagen und neutrophile Granulozyten zeigen somit kein Ansprechen auf die als Ligand des GR vermittelte Wirkung von Glukokortikoiden (Wüst et al. 2008). Neben dem ursprünglich verwendeten Hintergrund ist C57Bl/6, wurden in dieser Arbeit wurde zudem Mäuse mit einer Rückkreuzung auf den Balb/C-Hintergrund eingesetzt (Tuckermann et al. 2007).

### 2.2.2 DSS-induzierte Colitis als Modell der Colitis Ulcerosa in Mäusen

Die Versuchskohorten wurden zu möglichst gleichen Teilen aus weiblichen und männlichen Tieren im Alter von 10 – 14 Wochen (20 – 35 g) zusammengestellt.

Die gewünschte Krankheitsausprägung einer akuten Colitis wird mittels DSS induziert. Dieses wurde als 2 %-ige Lösung über das Trinkwasser verabreicht, wodurch die Epithelzellen geschädigt und die Barriere-Funktion beeinträchtigt wurde, wodurch sich eine Entzündung entwickelte (Wirtz et al. 2017). Die Lösung wurde über acht Tage verabreicht,

ab dem neunten Tag erhielten die Mäuse wieder normales Trinkwasser. Die DSS-Lösung wurde für jeden Versuch neu angesetzt und alle zwei Tage erneuert. Die Probenentnahme erfolgte je nach Versuchsgruppe am 10. Versuchstag zum Zeitpunkt der stärksten Krankheitsausprägung oder am 12. Versuchstag, an dem sich die Mäuse potenziell bereits in einer Rekonvaleszenz befanden.

### 2.2.3 DAI-Score der Colitis

Zur Beurteilung der Krankheitsschwere und des Krankheitsverlaufes wurde der DAI-Score (Krankheitsaktivitätsindex, *disease activity index*) angewandt. Dieser beinhaltet die Beurteilung der Gewichtsveränderung, der Stuhlkonsistenz und dem Vorhandensein von Blut im Stuhl. Der Summen-Score liegt zwischen 0, entspricht keinem Krankheitswert, und 10, entspricht der stärksten Krankheitsausprägung. Tiere die im Versuchsverlauf verstarben oder aus anderen Gründen aus dem Versuch ausgeschlossen wurden erhielten bis zum Versuchsende den Wert 12 (Reber et al. 2006; AlSharari et al. 2013). Tiere, die während der Induktion der akuten Colitis nicht mindestens einmal einen DAI-Score von 4,0 oder mehr erreichten, wurden aufgrund der fehlenden Krankheitsausprägung von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

#### 2.2.3.1 Gewichtsveränderung

Die Mäuse wurden auf einer Laborwaage gewogen, das Gewicht zu Beginn des Versuchs wurde als Referenzwert verwendet.

**Tabelle 10. Gewichtsreduktion**

Score-Wert	Gewichtsreduktion im Vergleich zum Ausgangsgewicht
0	0 – 1 %
1	1 – 5 %
2	5 – 10 %
3	10 – 15 %
4	> 15 %

Mäuse mit einem Gewichtsverlust von mehr als 20 % im Laufe des Versuches mussten aus Tierschutzgründen aus dem Versuch ausgeschlossen werden. Auch diese erhielten bis zum Ende des Versuchs einen Summen-Score von 12 Punkten.

#### 2.2.3.2 Stuhlkonsistenz

Der abgesetzte Stuhl wurde bei jedem einzelnen Tier bezüglich der Konsistenz bewertet, hierzu sollten die Mäuse zum Auffangen einzeln gesetzt werden.

**Tabelle 11. Stuhlkonsistenz**

Score-Wert	Stuhlkonsistenz
0	fest und geformt
1	weich und geformt
2	Diarrhoen



### 2.2.3.3 Blutbeimengung im Stuhl

Ein mit Blut versetzter Stuhl deutet auf eine akute Entzündung des Colons hin, hierzu wurde die tierspezifische Stuhlprobe auf sichtbare Blutbeimengungen untersucht. Waren keine sichtbaren Blutbeimengungen erkennbar, wurde die Stuhlprobe auf okkultes Blut mittels des hemoCare-Test (modifizierten Guajak-Prinzip) untersucht (McLoughlin und O'Morain 2006).

Tabelle 12. Blutbeimengung im Stuhl

Score-Wert	Klassifikation
0	kein (okkultes) Blut
1	schwach positiv auf okkultes Blut – grüne Färbung auf der Testkarte
2	stark positiv auf okkultes Blut – blaue Färbung auf der Testkarte
3	sichtbare Blutbeimengungen, rot gefärbter After
4	sichtbare Blutbeimengungen, mit Blut verklebter After

### 2.2.4 Probengewinnung

Zur Gewinnung der Proben wurden die Mäuse tierschutzgerecht mit CO<sub>2</sub> getötet und anschließend durch Blutleere sekundär getötet. Die Blutleere wurde durch direkte Punktion des Herzens von ventral durch den parasternalen Intercostalraum links erreicht. Das gewonnene Blut wurde in Serumröhrchen (BD Microtainer SST Tubes) nach Agglutination (mind. 30 min Wartezeit) bei 10.000 x g für 2 min ab zentrifugiert und der Überstand (Serum) bei -20 °C gelagert.

Anschließend wurde die Bauchhöhle mittels scharf-stumpfer Präparation eröffnet und das Darmpaket freigelegt. Nach Durchtrennung aboral des Magens, folgte die weitere Mobilisierung entlang des Mesenteriums bis maximal terminal das Sigmoid kurz vor dem After abgesetzt wurde. Die distale Absetzung des Colons erfolgte direkt oral des Caecums. Nach Messung der Colonlänge wurde das gewonnene Darmstück mit auf Eis gekühltem PBS durchgespült, um Stuhl- und Nahrungsreste zu entfernen.

Das gesäuberte Colonstück wurde auf einer Präparationsplatte aufgespannt und longitudinal eröffnet, letzte Nahrungsreste wurden mit PBS abgespült. Das Colongewebe wurde seitlich zur Begradigung beschnitten, die Abschnitte dienten weiterhin als Proben für die molekular-diagnostischen Verfahren und wurden umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Das nun eröffnete Colon wurde im Folgenden von aboral nach oral mit der luminalen Seite nach innen aufgerollt und mit einer feinen Nadel fixiert. Im Anschluss wurden die entstandenen *swiss-roles* (Whittem et al. 2010) über Nacht in 4 %-iger PFA-Lösung fixiert und danach bis zur weiteren Verwendung in PBS gelagert. Um die histologische Veränderung über die gesamte Länge des Colons bewerten zu können wurden die *swiss-role*-Technik angewandt (Yan et al. 2009).

## 2.3 Molekulardiagnostische Methoden

Im Rahmen des Entzündungsprozesses üben Zyto- und Chemokine ihre Wirkung aus. Zur weiteren Quantifizierung wurde einerseits die Genexpression mittels RT-qPCR, sowie die Sekretion mittels ELISA (enzymgekoppelten Immunadsorptionstest, *enzyme-linked immunosorbent assay*) bestimmt.

### 2.3.1 RNA-Isolation, Gewinnung der PolyA-RNA und cDNA-Synthese

Die nach der Probengewinnung direkt in flüssigem Stickstoff eingefrorenen und bei -80 °C gelagerten Gewebestücke des Colons wurden homogenisiert und die RNA mittels eines kommerziellen Kits (RNeasy plus Universal Kit) nach Herstellerangaben extrahiert. Hierzu wurde das gefrorene Gewebe in 900 µl QIAzol *lysis reagent* auf Eis gekühlt homogenisiert. Genomische DNA wurde im Anschluss mit 100 µl DNA-*eliminator solution* ausgefällt. Vor dem Abzentrifugieren mit 12.000 x g für 15 min bei 4 °C wird 180 µl Chloroform zugegeben und für 15 Sekunden mit dem Vortex vermischt. Die durch das Zentrifugieren entstandene Separierung der Phasen wurde genutzt, um nun die obere klare Phase abzuheben und mit 600 µl Ethanol 70 % zu versetzen. Die Lösung wurde auf RNeasy-Mini-Säulen aufgetragen und bei 8.000 x g ab zentrifugiert, das Eluat verworfen. Nach einem Waschschrift mit 700 µl RWT-Puffer und Zentrifugieren für 20 Sekunden bei 8.000 x g wurde nochmals mit 500 µl RPE-Puffer gespült und nun für 2 min bei 8.000 x g ab zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Säule für 1 min bei 8.000 x g getrocknet. Die Elution der RNA vom Säulenmaterial erfolgte durch Zugabe von zweimal 35 µl RNase-freiem Wasser mit anschließender Zentrifugation bei 8.000 x g für 1 min. Die Proben wurden umgehend bei -80 °C eingefroren und gelagert.

Um im weiteren Verlauf eine Inhibition der reversen Transkriptase durch zurückgebliebenes DSS im RNA-Extrakt zu vermeiden (Kerr et al. 2012; Do et al. 2017) wurde dieses nochmals mit einem kommerziellen Kit (Dynabeads mRNA DIRECT Kit) nach Herstellerangaben weiter aufgereinigt, um so die PolyA-RNA zu gewinnen. Die hierfür notwendige Messung der RNA-Konzentration erfolgte mit einem NanoDrop-Mikrovolumen-Spektrophotometer. Es wurden 75 µg totale RNA eingesetzt, die in RNase-freiem Wasser auf insgesamt 100 µl verdünnt und anschließend bei 65 °C für 2 min inkubiert wurden. Währenddessen wurden 200 µl zuvor gut resuspendierte Dynabeads im Magnet separiert und die Trägerlösung verworfen. Dann wurden diese zum Spülen mit 100 µl *binding buffer* resuspendiert, am Magnet separiert und wiederum der Überstand verworfen. Sodann mit 100 µl *binding buffer* gelöst und der vorbereiteten RNA-Probe vermischt. Dies sollte für 3 – 5 min bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch (500 rpm) erfolgen. Es erfolgten nach Separation auf dem Magnet und Verwerfen des Überstandes zwei Waschschriffe mit 200 µl *washing buffer B*, durch Vermischen, Separation auf dem Magnet und Abschütten des Überstandes. Abschließend erfolgte die Elution der PolyA-RNA von den Dynabeads mit 10 – 20 µl 10 mM TrisHCl für 2 min bei 80 °C.

Im Folgenden wurde die vorliegende RNA mittels eines kommerziellen Kits (*iScript cDNA synthesis kit*) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Der Puffer enthält Oligo(desoxythymidin)- und Random-Hexamer-Primer zur ungerichteten Amplifikation. Im Reaktionsansatz wurde PolyA-RNA verwendet. Dieser mittels eines Thermoblocks auf die gewünschten Temperaturen erhitzt.

Tabelle 13. cDNA-Synthese

Reaktionsansatz		Abschnitt	Temperatur	Zeit
5 µl	PolyA-RNA	Inkubieren	20 – 25 °C	5 min
4 µl	iScript Puffer	Reaktionsablauf	42 °C	30 min
0,25 µl	Reverse Transkriptase	Reaktionsabbruch	85 °C	5 min
auf 20 µl	mit DEPC H <sub>2</sub> O auffüllen			

Zur Ergebniskontrolle wurde die cDNA-Proben mittels PCR amplifiziert und im Folgenden per Agarose-Gelelektrophorese dargestellt. Als Referenz dient die Expression von *Hprt* (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*), die auch später bei der RT-qPCR als *housekeeping*-Gen herangezogen wurde.

Tabelle 14. PCR mit Pfu-Polymerase

Reaktionsansatz		Abschnitt	Temperatur	Zeit
1 µl	cDNA	initiale Denaturierung	98,5 °C	120 s
12,7 µl	destilliertes H <sub>2</sub> O	30 Zyklen:		
4 µl	HF-Puffer	Annealing	98,5 °C	20 s
1 µl	dNTP's	Elongation	64 °C	15 s
0,5 µl	<i>Hprt</i> Primer fwd (10 µM)	Denaturierung	72 °C	20 s
0,5 µl	<i>Hprt</i> Primer rwd (10 µM)			
0,3 µl	Pfu-Polymerase	abschließende Elongation	72 °C	120 s
		abkühlen	auf 4 °C	

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1 %-iges TAE-gepuffertes Agarose-Gel mit Ethidiumbromid hergestellt. Aufgetragen wurden 12 µl Marker und 17 µl Probe, die zuvor in 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und mit 7 µl OrangeG versetzt wurde. Die Laufzeit betrug 15 min, mit 150 V und 290 mA.

### 2.3.2 Quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Bestimmung der Genexpression von mRNA erfolgte mittels quantitativer Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-qPCR). Bei dieser Methode interkaliert während der Messung ein Fluoreszenzfarbstoff, hier SYBRGreen, in die DNA-Helix, sodass ein zur DNA-Menge proportionales Lichtsignal gemessen und damit eine quantitative Aussage über die Expression des jeweiligen Gens getroffen werden kann. Dieser Wert wurde zur Normalisierung mit der Expression eines Housekeeping-Gens, hier *Hprt*, ins Verhältnis gesetzt. Dies wurde in allen zu analysierenden Zellen gleichmäßig exprimiert. Die Messung selbst erfolgte nach der  $\Delta\Delta CT$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001). Um weitere Unterschiede in Bezug auf unterschiedliche Mengen an Makrophagen innerhalb der Proben zu reduzieren und die Vergleichbarkeit zu verbessern wurden die Ergebnisse abschließend auf die F4/80-Genexpression normalisiert. Makrophagen scheinen im Colon der GR<sup>lysM</sup>-Mäuse häufiger vorzukommen.

Die Probenansätze wurden in einer 96-well-Platte nach Hersteller Angaben wie folgend angesetzt. Nach Versiegeln und Sammeln am Gefäßboden wurde die Analyse in einem Applis Biosystems 7500 Real Time PCR System durchgeführt.

Tabelle 15. RT-qPCR mit SYBR-Green

Reaktionsansatz		Abschnitt	Temperatur	Zeit
1 µl	cDNA	Denaturierung 1	50 °C	120 s
12,5 µl	SYBR-Green Mastermix	Denaturierung 2	95 °C	600 s
11 µl	destilliertes H <sub>2</sub> O	40 Zyklen:		
0,5 µl	Primer Mix	Denaturierung	95 °C	15 s
		Annealing & Elongation	60 °C	60 s
		Schmelzkurve	60 °C	60 s
			95 °C	15 s

### 2.3.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Aus den durch Herzpunktion gewonnen Blutproben wurde in Serumröhrchen (BD Microtainer SST Tubes) nach erfolgter Agglutination durch Abzentrifugieren mit 10.000 x g für 2 min Serum gewonnen. Dieses wurde bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.

Die Bestimmung des systemischen IL-6-Spiegels erfolgte mittels eines kommerziellen Kits für ELISA (BioLegend). Die Analyse wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Hierfür wurden Mikrowell-Platten mit dem *capture-antibody* beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden diese dreimal mit 200 µl Waschpuffer gespült und anschließend, um die unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren, mit 200 µl *assay diluent* für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Nach dreimaligem Spülen der Platte mit Waschpuffer wurden 100 µl der Serumproben, sowie die zuvor angesetzte Standardreihe in Duplikaten aufgetragen und für 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach erneutem dreifachem Waschen mit Waschpuffer erfolgte das Auftragen von 100 µl *detection-antibody* und weitere Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur. Nach dem nächsten Spülschritt (3x Waschpuffer 200 µl) wurden die Platten mit *Avidin linked horse radish peroxidase* (HRP) inkubiert. Nach fünfmaligem Spülen mit jeweils 30 s Einwirkzeit wurde die Entwicklerlösung (*TMB-Substrate Solution*) aufgetragen und unter Lichtabschluss für 15 min bis zur Blaufärbung zur Reaktion gebracht. Durch Hinzugeben von 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde die Reaktion beendet und der Farbstoff änderte seine Farbe von blau zu gelb. Die Intensität wurde anschließend bei 450 nm gemessen.

## 2.4 Histologie

### 2.4.1 Herstellung der Präparate

Die, wie im Vorfeld beschrieben hergestellten und in PBS bis zur Verwendung gelagerten, *miss-role*-Präparate wurden im Folgenden in Gewebekassetten in einem automatisierten Prozess mittels einer aufsteigenden Alkohol- und Xenol-Reihe dehydriert und anschließend in Paraffin getränkt.

**Tabelle 16. Dehydration und Paraffineinbettung**

Abschnitt	Dauer
50 % Ethanol	60 min
70 % Ethanol	60 min
80 % Ethanol	60 min
80 % Ethanol	60 min
96 % Ethanol	90 min
96 % Ethanol	90 min
100 % Ethanol	90 min
100 % Ethanol	90 min
Xylol	60 min

Xylol	60 min
Paraffin	120 min
Paraffin	120 min

Am nächsten Tag wurden die Präparate in Paraffinblöcke eingegossen.

Aus den Paraffinblockpräparaten wurden mittels eines Mikrotoms 2 µm Schnitte angefertigt und auf Objektträger übertagen. Die angefertigten Schnitte auf den Objektträgern wurden über Nacht bei Raumtemperatur, dann eine weitere Nacht bei 50 °C getrocknet.

#### 2.4.2 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Zur Anfärbung wurden die Schnitte zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 15 min Xylol, 2x 2 min 99 % Ethanol, 2x 2 min 96% Ethanol, 2x 2 min 70 % Ethanol) entparaffiniert und rehydriert. Nach Spülen mit destilliertem Wasser und Färben für 10 min in Hämalaun-Lösung nach Mayer, sowie erneutem Spülen mit destilliertem Wasser erfolgte die Färbung mit Eosin 0,1 % für 2 min, sowie erneutes Spülen mit destilliertem Wasser. Anschließend wurden die so gefärbten Schnitte wieder dehydriert (2x 2 min 70 % Ethanol, 2x 2 min 96 % Ethanol, 2x 2 min 99 % Ethanol, 2x 15 min Xylol) und nach kurzer Trocknung mit Entellan eingedeckt.

#### 2.4.3 Scoring der Präparate

Die histopathologische Beurteilung der Präparate erfolgte verblindet. Diese wurden hierzu in einer Vergrößerung um den Faktor 200 und 400 analysiert und in ihrer gesamten Länge bezüglich der Kryptenatrophie, Inflammation bzw. Infiltration von Immunzellen sowie dem Verlust von Becherzellen beurteilt. Zur Bestimmung des *Inflammations-Scores* wurden diese Kriterien je nach Ausprägung (0 = keine, 1 = mild, 2 = moderat, 3 = schwer) eingeteilt und anschließend mit dem Prozentsatz der betroffenen Fläche der jeweiligen Ausprägung multipliziert. Das Endergebnis wurde auf eine Skala von 0 bis 10 normiert.

#### 2.4.4 Immunhistochemie

Es wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt, um gezielt einzelne Strukturen darzustellen. Die Markierung der Zielstrukturen erfolgte mit unterschiedlichen Primär-Antikörpern, die Färbung über HRP-gekoppelte Sekundär-Antikörper (ImmPRESS HRP Polymer Detection Kit) und DAB, die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Die primären Antikörper wurden in den folgenden Verdünnungsfaktoren aufgetragen: CD68 1:200, CD3 1:2000, GR1 1:200. Die immunhistochemischen Färbungen erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen (Jennifer Apelhans, Hannibal Bohnenberger).

Die immunhistochemische Anfärbung erfolgte nach Entparaffinierung und Rehydrierung einer absteigenden Alkoholreihe (2x 15 min Xylol, 2x 2 min 99 % Ethanol, 2x 2 min 96 % Ethanol, 2x 2 min 70 % Ethanol, 2x 2 min dest. H<sub>2</sub>O). Im Anschluss wurden die Schnitte für 15 min in Citrat-Puffer in der Mikrowelle gekocht und dann abkühlen gelassen. Nach Spülen zuerst mit destilliertem Wasser und anschließend mit PBS erfolgte der Peroxidase-Block in einer Hellendahl-Küvette (50 ml) mit 3 % Peroxidase in PBS für 10 – 20 min bei 4 °C. Die nachfolgende Inkubation erfolgte nach Spülen mit PBS mit 10 % FCS in PBS für weitere 20 min bei Raumtemperatur. Nach dem Dekantieren der Schnitte erfolgte der Auftrag des primären Antikörpers in benötigter Verdünnung in 10 % FCS/PBS über Nacht bei 4 °C. Nach Spülen mit PBS konnte am nächsten Tag der sekundären Antikörper (*anti-rat IgG biotin/anti-rabbit IgG*) 1:200 in 10 % FCS/PBS für 1 h bei Raumtemperatur zum Inkubieren aufgetragen werden. Danach wurde erneut gespült. Dann wurde Streptavidin-Peroxidase (HRP) 1:1000 in 10 % FCS in PBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Spülschritt mit PBS erfolgte die Entwicklung mit DAB in einer Küvette für 1 – 2 min bei Raumtemperatur. Diese wurde mit destilliertem Wasser gestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte anschließend mit Hämalaun für 20 s, das sodann mit Leitungswasser gebläut wurde. Nach der Färbung wurden die Schnitte wieder dehydriert (2x 2 min 70 % Ethanol, 2x 2 min 96 % Ethanol, 2x 2 min 99 % Ethanol, 2x 15 min Xylol) und mit Entellan eingedeckt.

## 2.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die Analyse wurde mittels ungepaartem t-Test durchgeführt. Eine Signifikanz der Ergebnisse wurde bei p-Werten unter 0,05 postuliert. Signifikante Ergebnisse sind mit \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  gekennzeichnet.

## 3 Ergebnisse

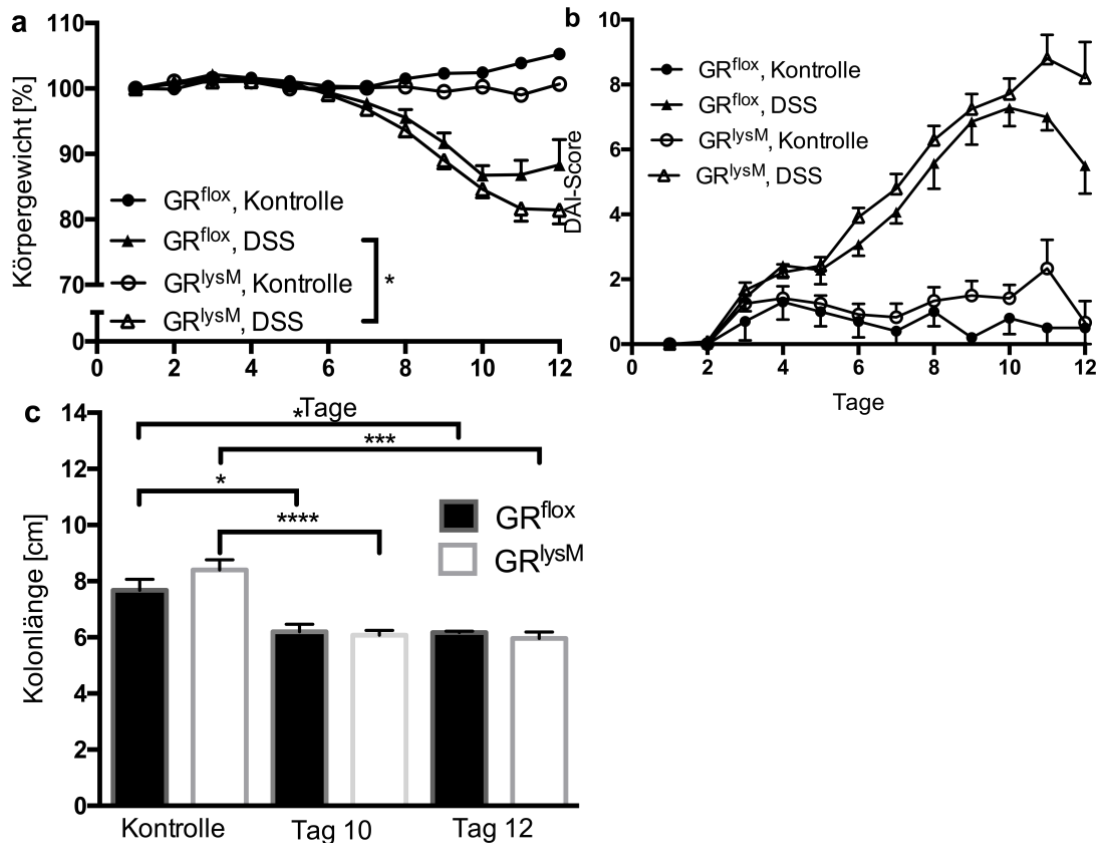
### 3.1 Auswirkung der GR-Ablation in myeloischen Zellen ( $GR^{lysM}$ ) auf die DSS-induzierte Colitis in Mäusen auf C57/B16-Hintergrund

Im Modell der  $GR^{lysM}$ -Mäuse ist durch Deletion des GR in den Zellen der myeloiden Reihe die Reaktivität auf die als Ligand des GR wirkenden Glukokortikoide ausgeschaltet. Zur Bestimmung der unterschiedlichen Krankheitsausprägungen wurden die  $GR^{lysM}$ -Mäuse im Vergleich zur  $GR^{lox}$ -Kontrollmäusen untersucht. Beurteilt wurden die klinische Ausprägung mittels Gewichtsverlauf und Krankheitsaktivität (DAI-Score), die Gewebeveränderungen mittels histologischen und immunhistochemischen Verfahren und die lokale sowie systemische Zytokinmilieus mittels ELISA und RT-qPCR.

#### 3.1.1 Krankheitsausprägung der DSS-induzierten Colitis

Im Rahmen der Behandlung mit DSS über 8 Tage zur Induktion der akuten Colitis zeigte sich, dass die behandelten Mäuse im Gegensatz zu den unbehandelten Mäusen der Kontrollgruppe unabhängig von ihrem Genotyp stetig an Gewicht verloren. Sehr ausgeprägt zeigte sich dies innerhalb der Versuchstage 7 bis 10 (Abbildung 3 a). Auffällig war, dass sich die Tiere der Gruppe mit normaler Expression des GR ( $GR^{lox}$ ) sich nach Ende der 8 Tage begannen zu erholen und wieder an Gewicht zunahmen. Die  $GR^{lysM}$ -Mäuse hingegen verloren weiter an Gewicht (Abbildung 3 a). Der Unterschied im Gewichtsverlust an Tag 11 und 12 zwischen  $GR^{lox}$  und  $GR^{lysM}$ -Mäusen war signifikant. Dieselbe Beobachtung zeigte sich auch in der Krankheitsaktivität. Der DAI-Score stieg in den behandelten Gruppen sowohl der  $GR^{lysM}$ -Mäuse als auch der  $GR^{lox}$ -Mäuse bis zu Tag 10 an. Im weiteren Verlauf sank dieser in der  $GR^{lox}$ -Gruppe ab, wobei er in den  $GR^{lysM}$ -Mäusen zunächst noch weiter anstieg (Abbildung 3 b). Hier zeigte sich eine deutliche Tendenz, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die klinischen Symptomatik der akuten Colitis drückten sich auch in einer Verkürzung der Colonlänge an Tag 10 in beiden Genotypen aus. Diese blieb bis Tag 12 weiter bestehen und veränderte sich nicht zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 3 c).





**Abbildung 3. Krankheitsausprägung der DDS-induzierten Colitis in GR<sup>lysM</sup>- und GR<sup>lox</sup>-Mäusen auf einem C57/Bl6-Hintergrund**

Zur Induktion einer Colitis wurden die Mäuse mit 2 % DSS im Trinkwasser für 8 Tage behandelt. Die Kontrollengruppen erhielten Trinkwasser ohne Zusatz. (a) Das Körpergewicht wurde täglich gewogen und in Relation zum Ausgangsgewicht zu Versuchsbeginn bezogen. (b) Die Krankheitsaktivität wird als DAI-Score, bestehend aus Stuhlkonsistenz, Körpergewicht und fäkalem Blutabgang, von 0 bis 10 Punkte bewertet. GR<sup>lox</sup> n = 5/7 (Kontrolle/DSS), GR<sup>lysM</sup> n = 6/12 (Kontrolle/DSS) (c) Die Mäuse wurden am 10. oder 12. Tag getötet, der Colon entfernt und seine Länge vom Caecum bis zum Rektum gemessen. GR<sup>lox</sup> n = 5/3/4 (Kontrolle/10. Tag/12. Tag), GR<sup>lysM</sup> n = 6/7/5 (Kontrolle/10. Tag/12. Tag). Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test (\*: p < 0,05, \*\*: p < 0,01, \*\*\*: p < 0,001, \*\*\*\*: p < 0,0001). Die statistische Analyse in Abbildung 3 a und b wurde auf die Zeitspanne zwischen Tag 11 und 12 beschränkt.

### 3.1.2 Systemische Zytokinsekretion im Rahmen der DSS-induzierten Colitis

Zur Untersuchung der systemischen Zytokinspiegel wurde der IL-6-Serumspiegel im Blut mittels ELISA bestimmt. Parallel zur klinischen Entzündungsreaktion stiegen auch die systemischen Konzentrationen des pro-inflammatorischen Zytokines IL-6 zum 10. Tag deutlich an und erreichten Werte zwischen 30 und 40 pg/ml. In den GR<sup>lox</sup>-Mäusen normalisierten sich diese parallel zur Symptomatik bis zum 12. Tag wieder annähernd auf den Ausgangswert. In der Gruppe der GR<sup>lysM</sup>-Mäuse hingegen sank der Spiegel vom 10. zum 12. Tag, wenn überhaupt nur sehr wenig, ohne einen signifikanten Unterschied. Am 12. Tag waren die IL-6-Spiegel in den GR<sup>lysM</sup>-Mäusen daher signifikant höher als in den GR<sup>lox</sup>-Mäusen (Abbildung 4).

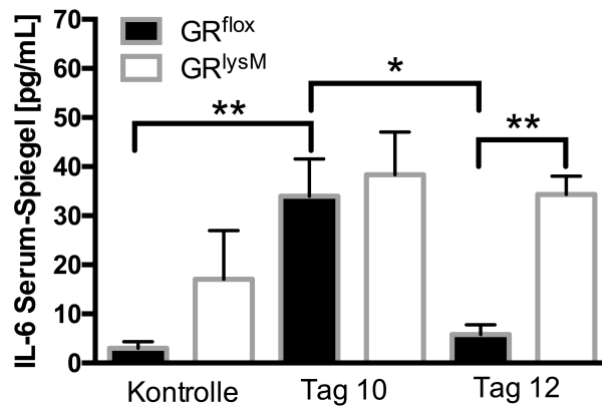


Abbildung 4. IL-6 Serumspiegel in der DDS-induzierten Colitis in GR<sup>lysM</sup>- und GR<sup>flox</sup>-Mäusen

Zur Induktion einer Colitis wurden die Mäuse mit 2 % DSS im Trinkwasser für 8 Tage behandelt. Die Kontrollengruppen erhielten Trinkwasser ohne Zusatz. Die Mäuse wurden am 10. oder 12. Tag getötet und Blut durch Punktion des Herzens gesammelt. Der IL-6-Serumspiegel wurde mittels ELISA bestimmt. GR<sup>flox</sup> n = 5/2/3 (Kontrolle/10. Tag/12. Tag), GR<sup>lysM</sup> n = 5/7/5 (Kontrolle/10. Tag/12. Tag). Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test (\* : p < 0,05, \*\* : p < 0,01).

### 3.1.3 Histologische Beurteilung der Entzündungsreaktion im Colon im Rahmen der DSS-induzierten Colitis

Die Entzündungsaktivität im Gewebe wurde mittels *swiss-rol*-Technik über die gesamte Länge des Colons beurteilt. In der histologischen Untersuchung von Gewebeschnitten, die mittels HE-Färbung angefärbt wurden, zeigte sich eine massive Zerstörung der Epithelien, eine Kryptenatrophie, der Verlust von Becherzellen und eine Infiltration von Immunzellen. Während der Bewertung der Gewebeschnitte fiel auf, dass die stärkste Ausprägung der Entzündungsreaktion vor allem im distalen Anteil des Colons zu finden war (Abbildung 5).

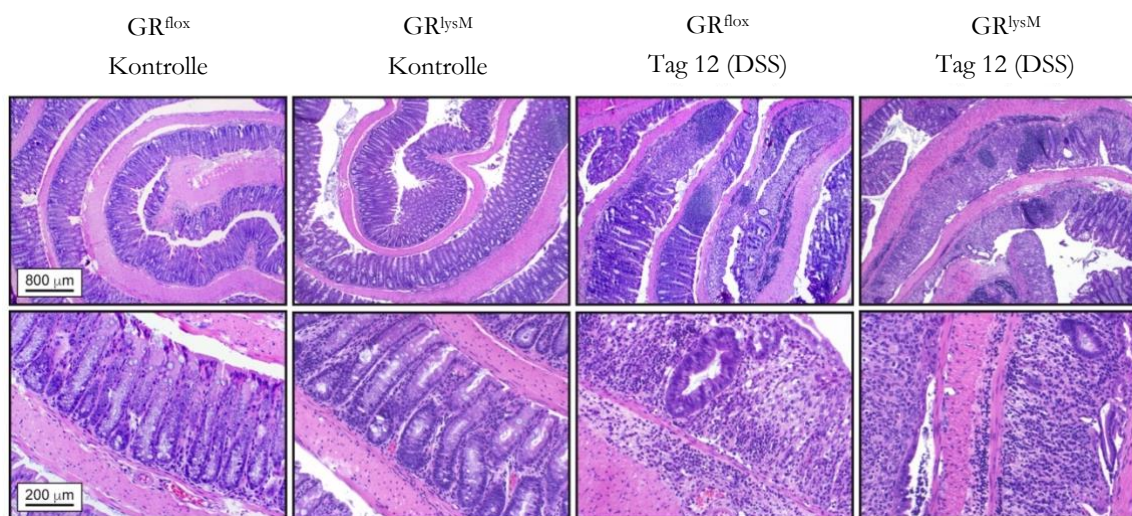
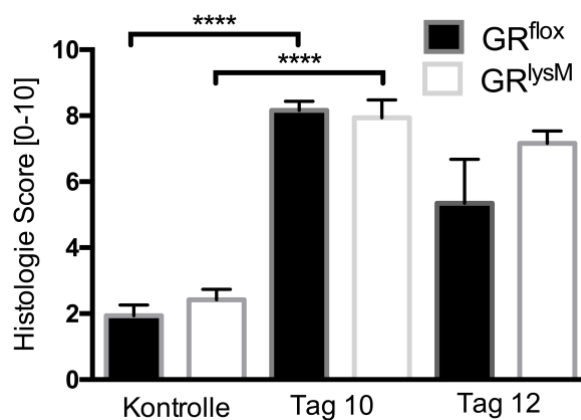


Abbildung 5. HE-Färbung von Colonschnitten in der DSS-induzierten Colitis in GR<sup>lysM</sup>- und GR<sup>flox</sup>-Mäusen

Zur Induktion einer Colitis wurden die Mäuse mit 2 % DSS im Trinkwasser für 8 Tage behandelt. Die Kontrollengruppen erhielten Trinkwasser ohne Zusatz. Die Mäuse wurden am 10. oder 12. Tag getötet, der

Colon entfernt, gespült, longitudinal eröffnet und anschließend von distal nach proximal aufgerollt. Die Präparate wurden als 2 µm dicke Schnitte mittels HE-Färbung gefärbt und bezüglich Kryptenatrophie, Inflammation bzw. Infiltration von Immunzellen, sowie dem Verlust von Becherzellen beurteilt. Repräsentative Ausschnitte wurden in 50-facher (obere Reihe) und 200-facher (untere Reihe) Vergrößerung festgehalten. Insbesondere die stärker vergrößerten Abschnitte sind repräsentativ für stark entzündete Bereiche des Colons (Meers et al. 2018) (CC BY).

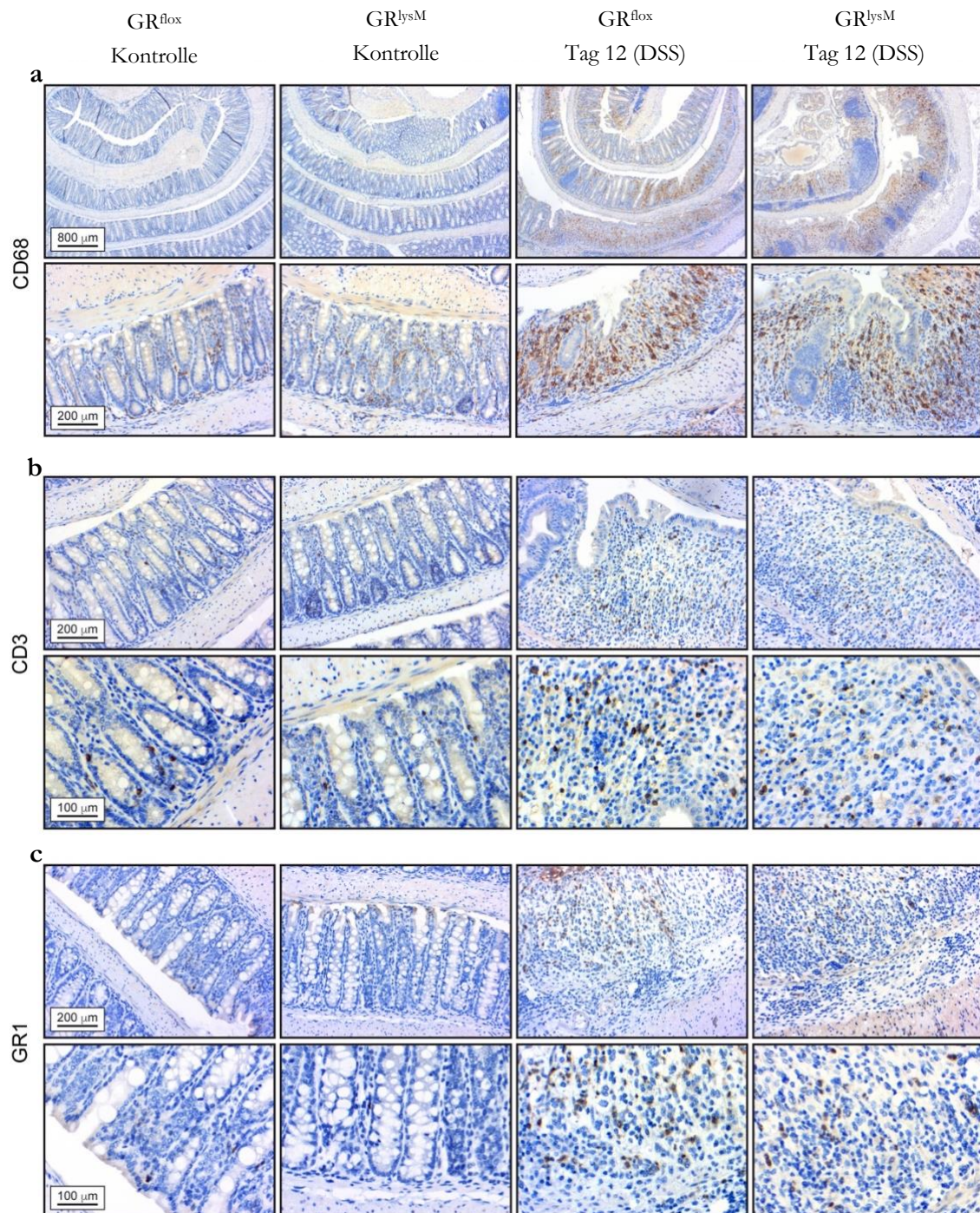
Die Quantifizierung der Entzündungsreaktion ergab für beide Gruppen signifikant veränderte Werte am Tag 10, die ausgeprägte Gewebeschäden nachweisen. An Tag 12 unterschieden sich die Gewebeschäden zwischen GR<sup>flox</sup>- und GR<sup>lysM</sup>-Mäusen etwas, die Gruppe der GR<sup>lysM</sup>-Mäuse scheint diese weniger schnell reparieren zu können. Signifikante Unterschiede bestehen nicht (Abbildung 6).



**Abbildung 6. Histologie Score der Colonentzündung in der DSS-induzierten Colitis in GR<sup>lysM</sup>- und GR<sup>flox</sup>-Mäusen**

Zur Induktion einer Colitis wurden die Mäuse mit 2 % DSS im Trinkwasser für 8 Tage behandelt. Die Kontrollengruppen erhielten Trinkwasser ohne Zusatz. Die Mäuse wurden am 10. oder 12. Tag getötet, der Colon entfernt, gespült, longitudinal eröffnet und anschließend von distal nach proximal aufgerollt. Die Präparate wurden mittels HE-Färbung gefärbt und bezüglich Kryptenatrophie, Inflammation bzw. Infiltration von Immunzellen sowie dem Verlust von Becherzellen beurteilt. GR<sup>flox</sup> n = 5/3/4 (Kontrolle/10. Tag/12. Tag), GR<sup>lysM</sup> n = 6/7/5 (Kontrolle/10. Tag/12. Tag). Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test (: p < 0,05, \*\* : p < 0,01, \*\*\* : p < 0,001).

Zur weiteren Differenzierung der Immunzellen im betroffenen Colongewebe wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt. Die Antikörper wurden so gewählt, damit Makrophagen (CD68), T-Zellen (CD3) und neutrophile Granulozyten (Granulozyten-Rezeptor-1 – GR1) voneinander zu unterschieden werden konnten (Abbildung 7 a, b, c). Die Kontrollgruppen zeigen in der Lamina propria vor allem Makrophagen, während T-Zellen oder neutrophile Granulozyten dort nur selten zu finden sind. An Tag 12 sind sowohl in den GR<sup>flox</sup>- als auch GR<sup>lysM</sup>-Mäusen alle drei Zelltypen in das Colongewebe infiltriert. Weiterhin stellen Makrophagen mit Abstand die größte Leukozyten-Untergruppe dar.



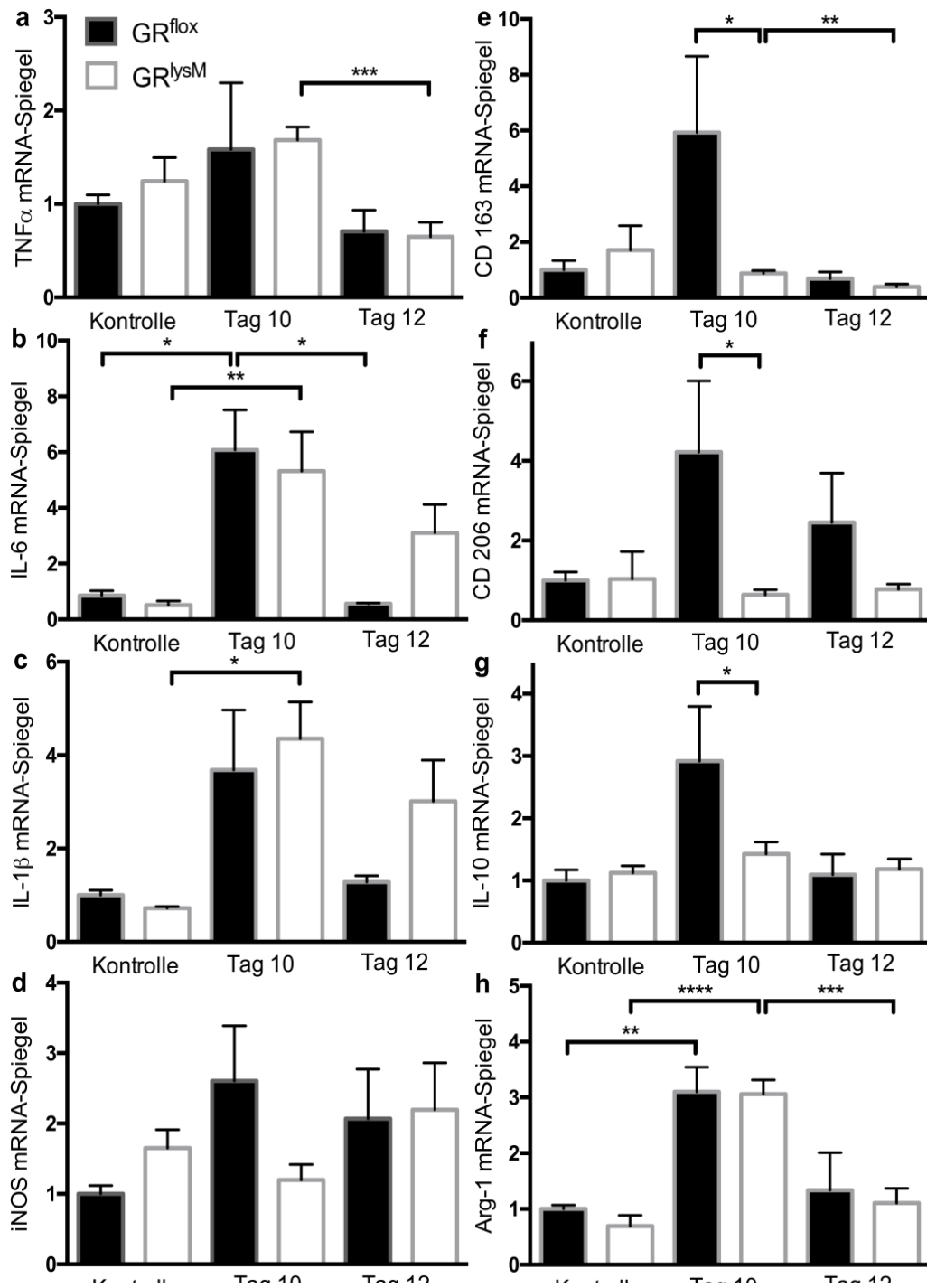
**Abbildung 7. Immunhistochemische Beurteilung der Colontzündung in der DSS-induzierten Colitis in  $GR^{lysM}$ - und  $GR^{lox}$ -Mäusen**

Zur Induktion einer Colitis wurden die Mäuse mit 2 % DSS im Trinkwasser für 8 Tage behandelt. Die Kontrollengruppen erhielten Trinkwasser ohne Zusatz. Die Mäuse wurden am 10. oder 12. Tag getötet, der Colon entfernt, gespült, longitudinal eröffnet und anschließend von distal nach proximal aufgerollt. Repräsentative 2  $\mu$ m Schnitte des Colongewebes wurden für die Immunhistochemie ausgewählt. (a) Mit anti-CD68-Antikörper inkubierte Schnitte wurden in 50-facher (obere Reihe) und 200-facher (untere Reihe) Vergrößerung festgehalten. (b) Mit anti-CD3- oder (c) anti-GR1-Antikörper inkubierte Schnitte wurden bei 200-facher (obere Reihe) oder 400-facher (untere Reihe) Vergrößerung festgehalten. Insbesondere die stärker vergrößerten Abschnitte sind repräsentativ für stark entzündete Bereiche des Colons (Meers et al. 2018) (CC BY).

### 3.1.4 Regulation der Genexpression im Dickdarm

Neben den systemischen Veränderungen der Zytokinspiegel wurden auch die lokalen Veränderungen im Darmgewebe untersucht. Hierzu wurden Darmabschnitte mittels RT-qPCR auf die Expression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen und Scavenger-Rezeptoren an Tag 10 und 12 untersucht. Die Resultate wurden auf *Hprt* als Housekeeping-Gen bezogen und anschließend zur Vergleichbarkeit auf die F480-Expression normalisiert.

Die mRNA-Spiegel (Boten-RNA, *messenger-RNA*) von TNF- $\alpha$  waren während der Induktion der DSS-induzierten Colitis weitestgehend unverändert, stiegen allemal ein wenig – jedoch ohne eine Signifikanz – an. An Tag 12 waren die Spiegel in beiden Gruppen erniedrigt, in den GR<sup>lysM</sup>-Mäusen signifikant niedriger zu Tag 10 (Abbildung 8 a). Die mRNA-Spiegel von IL-1 $\beta$  und IL-6 stiegen zu Tag 10 jeweils in beiden Gruppen deutlich an. Die Unterschiede waren ausgenommen der IL-1 $\beta$  Expression in GR<sup>lox</sup>-Mäusen signifikant. An Tag 12 entsprachen sie in den GR<sup>lox</sup>-Mäusen wieder dem Ausgangswert, während sie in den GR<sup>lysM</sup>-Mäusen weiterhin hochreguliert blieben (Abbildung 8 b, c). Die Expression von iNOS zeigte keine signifikante Veränderung (Abbildung 8 d). Die Regulation von Arg-1, welches ebenso an der Stickstoffmonoxid-Produktion beteiligt ist, wurde in beiden Gruppen an Tag 10 signifikant hochreguliert und nahm dann wieder den Ausgangswert an. Ein Unterschied zwischen den Gruppen fiel nicht auf (Abbildung 8 h). Allerdings zeigte sich, dass die mRNA-Spiegel von CD163, CD206 und IL-10 in den GR<sup>lox</sup>-Mäusen an Tag 10 stark hochreguliert wurden. Während sie in den GR<sup>lysM</sup>-Mäusen unverändert blieben. An Tag 12 fielen sie wieder auf das Ausgangsniveau zurück, mit Ausnahme von CD206 das weiterhin erhöht blieb (Abbildung 8 e, f, g).



**Abbildung 8. Regulation der Genexpression im Dickdarm in der DSS-induzierten Colitis in GR<sup>lysM</sup>- und GR<sup>lox</sup>-Mäusen**

Zur Induktion einer Colitis wurden die Mäuse mit 2 % DSS im Trinkwasser für 8 Tage behandelt. Die Kontrollengruppen erhielten Trinkwasser ohne Zusatz. Die Mäuse wurden am 10. oder 12. Tag getötet, Gewebeproben aus dem Colon gesammelt und daraus mRNA isoliert. Mittels RT-qPCR wurde die relative mRNA-Expression der M1-Gene IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und iNOS, sowie der M2-Gene CD163, CD206, IL-10 und Arg-1 bestimmt und mittels *Hprt* standardisiert. Im Anschluss wurden die Werte mit dem F480-mRNA-Spiegeln der jeweiligen Probe normalisiert und die Expression in unbehandelten GR<sup>lox</sup>-Mäusen (Kontrolle) auf eins gesetzt. GR<sup>lox</sup> n = 4/5/4 (Kontrolle/10. Tag/12. Tag), GR<sup>lysM</sup> n = 6/10/8 (Kontrolle/10. Tag/12. Tag). Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test (\* : p < 0,05, \*\* : p < 0,01, \*\*\* : p < 0,001, \*\*\*\* : p < 0,0001).

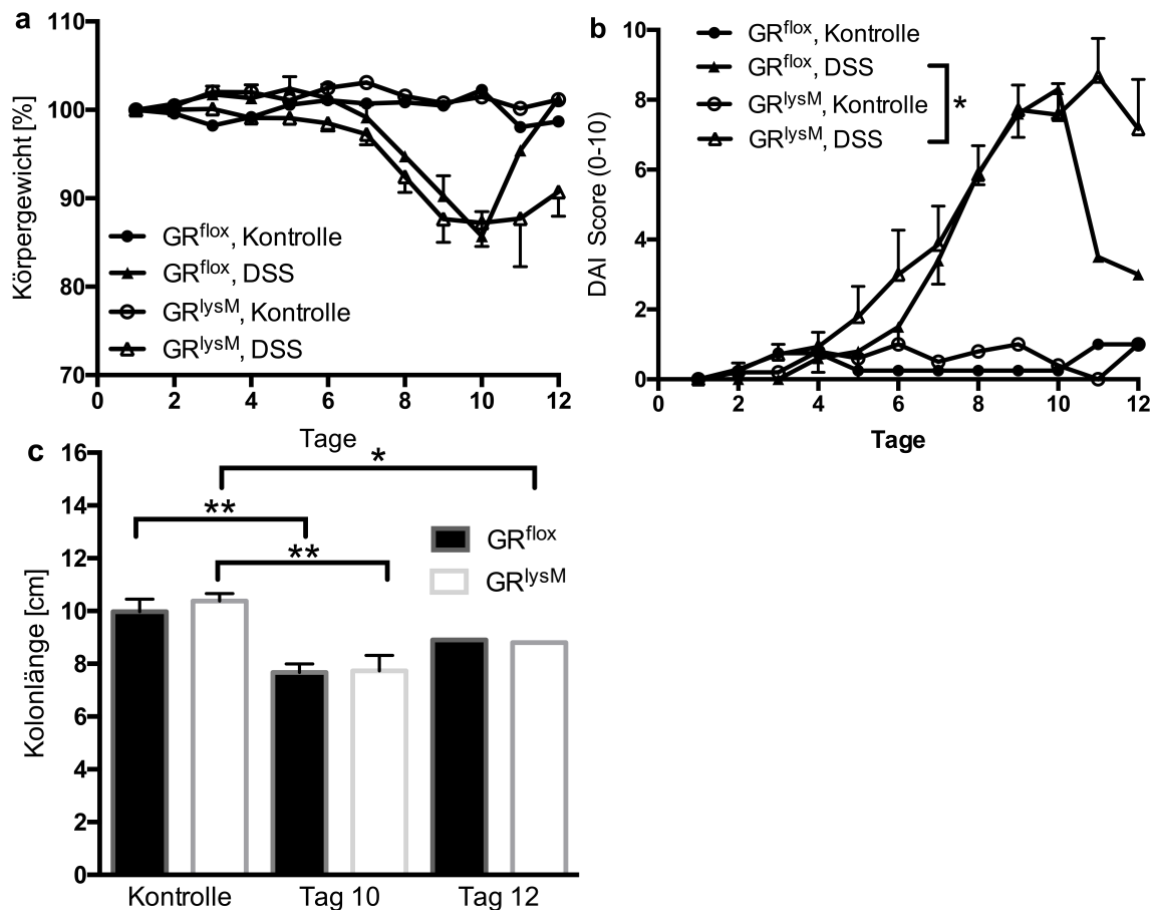
### 3.2 Auswirkung der GR-Ablation in myeloischen Zellen ( $GR^{lysM}$ ) auf die DSS-induzierte Colitis in Mäusen auf Balb/C-Hintergrund

Im Rahmen weiterer Versuche sollte zusätzlich überprüft werden, ob sich die genetische Prädisposition zugunsten einer durch Th-2-Zellen vermittelten humoralen Immunität auf den Verlauf der Colitis auswirkt. Daher wurde eine Untersuchungsreihe mit  $GR^{lysM}$ - und  $GR^{lox}$ -Mäusen auf dem Balb/C-Hintergrund angeschlossen.

#### 3.2.1 Krankheitsausprägung der DSS-induzierten Colitis

Die akute Colitis, die durch Behandlung mit DSS über 8 Tage ausgelöst wurde, zeigte auch in dieser Untersuchung unabhängig vom Genotyp einen deutlichen Gewichtsverlust in der Gruppe der behandelten Tiere innerhalb der Versuchstage 7 – 10 (Abbildung 9 a). Wie zuvor für C57/Bl6-Mäuse gezeigt, erholten sich die Tiere aus der  $GR^{lox}$ -Gruppe nach Beendigung der DSS-Zufuhr prompt und nahmen wieder an Gewicht zu. Die Mäuse der  $GR^{lysM}$ -Gruppe nahmen hingegen nur langsam wieder an Gewicht zu (Abbildung 9 a). Parallel hierzu war auch die Krankheitsaktivität entsprechend ausgeprägt. Während beide Gruppen in gleichem Maße krank wurden, erholten sich die  $GR^{lox}$ -Mäuse schneller. Die Krankheitsaktivität der  $GR^{lysM}$ -Mäuse stieg bis Tag 11 noch weiter an, zu Tag 12 nahm sie jedoch bereits wieder ein wenig ab (Abbildung 9 b). Der Unterschied in der Krankheitsaktivität an Tag 11 und 12 zwischen den  $GR^{lox}$ - und  $GR^{lysM}$ -Mäusen war signifikant.

Die klinischen Symptome der akuten Colitis drückten sich auch in einer Verkürzung der Colonlänge an Tag 10 in beiden Genotypen aus. Diese blieb bis Tag 12 weiter bestehen und veränderte sich nicht zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 9 c).



**Abbildung 9. Krankheitsausprägung in der DDS-induzierten Colitis in GR<sup>lysM</sup>- und GR<sup>flox</sup>-Mäusen auf Balb/C-Hintergrund**

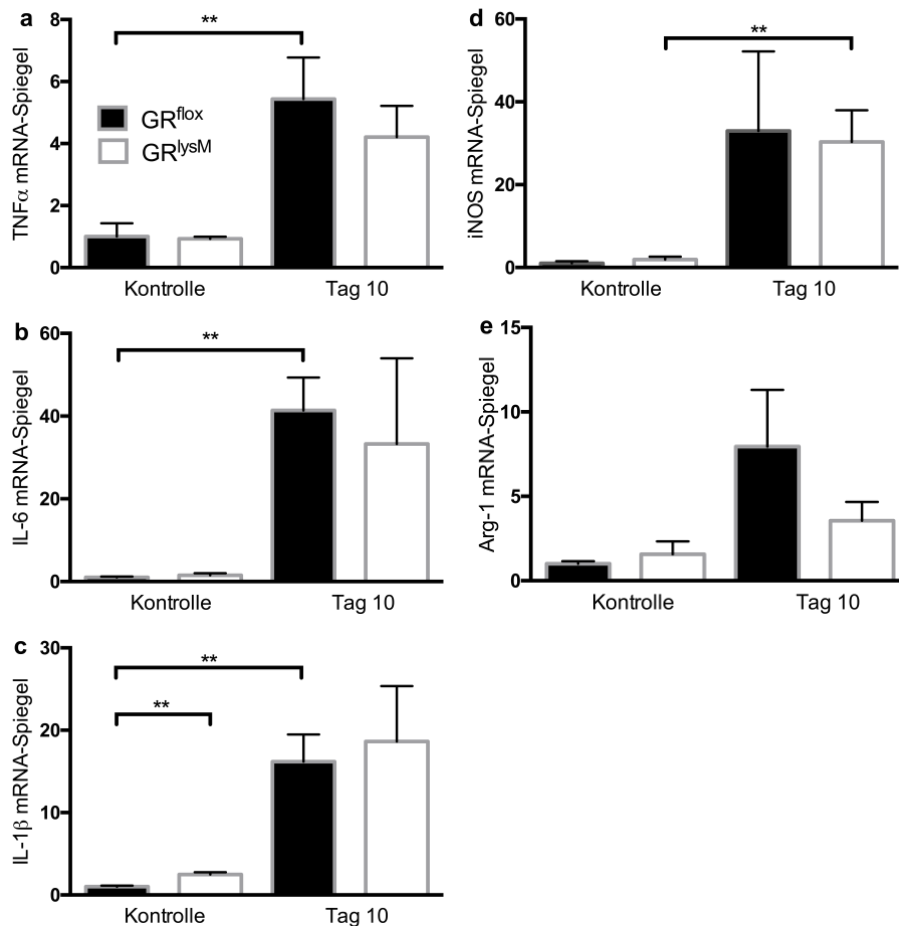
Zur Induktion einer Colitis wurden die Mäuse mit 2 % DSS im Trinkwasser für 8 Tage behandelt. Die Kontrollengruppen erhielten Trinkwasser ohne Zusatz. (a) Das Körpergewicht wurde täglich gewogen und in Relation auf das Ausgangsgewicht zu Versuchsbeginn bezogen. (b) Die Krankheitsaktivität wird als DAI-Score, bestehend aus Stuhlkonsistenz, Körpergewicht und fäkalem Blutabgang, von 0 bis 10 Punkte bewertet. GR<sup>flox</sup> n = 4/5 (Kontrolle/DSS), GR<sup>lysM</sup> n = 5/7 (Kontrolle/DSS) (c) Die Mäuse wurden am 10. oder 12. Tag getötet, der Colon entfernt und ihre Länge vom Caecum bis zum Rektum gemessen. GR<sup>flox</sup> n = 4/4/1 (Kontrolle/10. Tag/12. Tag), GR<sup>lysM</sup> n = 5/4/3 (Kontrolle/10. Tag/12. Tag). Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test (\*: p < 0,05, \*\*: p < 0,01). Die statistische Analyse in Abbildung 9 a und b wurde auf die Zeitspanne zwischen Tag 11 und 12 beschränkt.

### 3.2.2 Regulation der Genexpression im Dickdarm

Darmabschnitte von Tieren aller Versuchsgruppen wurden mittels RT-qPCR auf die Expression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen an Tag 10 und 12 untersucht, um die lokalen Veränderungen im Darmgewebe zu beurteilen. Die Resultate wurden auf *Hprt* als Housekeeping-Gen bezogen und anschließend zur Vergleichbarkeit auf die *F480*-Expression normalisiert. Für Tag 12 lag nur eine zu geringe Datenmenge vor, da zu viele Tiere aus dem Versuch ausgeschlossen werden mussten und die Daten daher nicht in die Auswertung eingeschlossen werden konnten.



Die mRNA-Spiegel von TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  und iNOS wurden in beiden Gruppen an Tag 10 hochreguliert. In den GR<sup>lox</sup>-Mäusen zeigte sich bei TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , in den GR<sup>lysM</sup>-Mäusen bei iNOS ein signifikanter Unterschied (Abbildung 10 a – d). Interessanterweise war in den Kontrollgruppen der Ausgangswert für IL-1 $\beta$  bereits signifikant unterschiedlich (Abbildung 10 c). Auch die Expression von Arg-1 war in beiden Gruppen an Tag 10 erhöht. Obgleich deutet sich die Tendenz eines geringeren Anstieges in den GR<sup>lysM</sup>-Mäusen – jedoch ohne Signifikanz – an (Abbildung 10 e).



**Abbildung 10. Regulation der Genexpression in der DSS-induzierten Colitis in GR<sup>lysM</sup>- und GR<sup>lox</sup>-Mäusen auf Balb/C-Hintergrund**

Zur Induktion einer Colitis wurden die Mäuse mit 2 % DSS im Trinkwasser für 8 Tage behandelt. Die Kontrollengruppen erhielten Trinkwasser ohne Zusatz. Die Mäuse wurden am 10. Tag getötet, Gewebeproben aus dem Colon gesammelt und daraus mRNA isoliert. Mittels RT-qPCR wurde die relative mRNA-Expression der M1-Gene IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und iNOS, sowie des M2-Gens Arg-1 bestimmt und mittels *Hprt* standardisiert. Im Anschluss wurden die Werte mit dem *F480*-mRNA-Spiegel der jeweiligen Probe normalisiert und die Expression in unbehandelten GR<sup>lox</sup>-Mäusen (Kontrolle) auf eins gesetzt. GR<sup>lox</sup> n = 4/4/3 (Kontrolle/10. Tag/12. Tag), GR<sup>lysM</sup> n = 5/6/5 (Kontrolle/10. Tag/12. Tag). Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test (\* : p < 0,05, \*\* : p < 0,01).

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit werden Beiträge zu einem besseren Verständnis geliefert, inwiefern der GR in myeloischen Zellen die Aktivität einer akuten Colitis in einem Tiermodell für Colitis Ulcerosa beeinflusst.

### 4.1 Rolle von Makrophagen in der Pathogenese der Colitis

Die Behandlung von Mäusen mit DSS ist ein etabliertes Modell, um die Funktion des angeborenen Immunsystems bei der Entwicklung einer akuten intestinalen Entzündung zu untersuchen. Die herbeigeführte Schädigung der Dickdarmschleimhaut und die damit verbundene schwere Colitis ähnelt in einigen Merkmalen den Schüben einer humanen Colitis Ulcerosa (Okayasu et al. 1990; Wirtz et al. 2017). Durch die zerstörte Barrierefunktion des Darms kommen Immunzellen mit Pathogenen in Kontakt und initiieren eine Immunantwort (Hernández-Chirlaque et al. 2016). Eine besondere Rolle in den lokalen Immunmechanismen spielen dabei Makrophagen, respektive myeloische Zellen. Die residenten Makrophagen sind ein relevanter Teil der Darmhomöostase indem sie Pathogene vor Ort phagozytieren und zerstören, in der Regel jedoch keine starke pro-inflammatorische Immunreaktion induzieren. (Heinsbroek und Gordon 2009). Das Gleichgewicht der einwandernden Makrophagen zugunsten einer pro- oder anti-inflammatorischen Polarisierung hängt vor allem auch von der lokalen Mikroumgebung ab, wird aber auch durch Zytokine und Glukokortikoide beeinflusst (Rivollier et al. 2012). Schübe chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen werden bis heute mit Glukokortikoiden als Standard der Erstlinientherapie behandelt (Kucharzik et al. 2020b). Ihre immunmodulierende Wirkung hängt unter anderem damit zusammen, dass sie in der Lage sind in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowohl die Sekretion von pro-inflammatorischen Immunmodulatoren zu unterdrücken (Tuckermann et al. 2005; Kleiman et al. 2012; Vettorazzi et al. 2015), als auch einen anti-inflammatorischen Phänotyp zu induzieren (Schweingruber et al. 2011). Die Frage, inwiefern die Aktivität der myeloischen Zellen durch am GR wirkende endogene Glukokortikoide beeinflusst wird und damit die intestinale Entzündung verändert, war die Kernfrage dieser Arbeit.

### 4.2 Auswirkung der GR-Ablation in myeloischen Zellen

Die akute Entwicklung der intestinalen Entzündung ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit nicht durch das Fehlen des GR in den myeloischen Zellen beeinflusst. So ist die Ausprägung der Gewebeschäden, die Krankheitsaktivität und auch die Produktion von Zytokinen gleich stark ausgeprägt, unabhängig von der GR-Expression. Allerdings zeigt sich nach Beendigung der Zufuhr von DSS und damit der Einleitung der Rekonvaleszenzphase, dass die fehlende Kontrolle der Makrophagen durch endogene Glukokortikoide in der Ausheilung bzw. Induktion von Gewebereparaturmechanismen entscheidend ist. Die mutanten Mäuse zeigten hier eine anhaltende Beeinträchtigung und verzögerte Erholung von der akuten Colitis. Die

stärkste Krankheitsausprägung und damit der Höhepunkt der Erkrankung zeigte sich in beiden Gruppen an Tag 10. Die Mäuse der Kontrollgruppe (GR<sup>flox</sup>) zeigten ab Tag 10 sowohl in der klinischen Bewertung als auch in der histopathologischen Beurteilung rückläufige Werte. Die Gruppe mutanter Mäuse (GR<sup>lysM</sup>) hingegen zeigte keine relevante Verbesserung, verlor weiter Gewicht und wies einen weiteren Anstieg der klinischen Krankheitsausprägung (DAI-Score) auf. Diese Befunde belegen, dass die Expression des GR in myeloischen Zellen ein essenzieller Faktor für die Einleitung von Gewebereparaturmechanismen bei intestinalen Entzündungen darstellt. Dies deckt sich mit Erkenntnissen aus anderen Krankheitsmodellen, in denen Glukokortikoide eine M2-Polarisation induzierten (Schweingruber et al. 2011) bzw. die Phagozytoseaktivität hemmen (Thomas et al. 2021) und auf diesem Wege sowohl die Entzündungsreaktion beenden als auch die Gewebereparatur initiieren (Diaz-Jimenez et al. 2021).

### 4.3 Histopathologisches Korrelat der Entzündung und Makrophageninfiltration

Die Erkenntnisse zum Krankheitsverlauf decken sich außerdem mit den histopathologischen Befunden. Beide Gruppen wiesen an Tag 10 ausgeprägte Gewebeschäden im Rahmen der intestinalen Entzündung, charakterisiert durch eine massive Zerstörung der Epithelien, eine Kryptenatrophie, den Verlust von Becherzellen und eine Infiltration von Immunzellen, auf. Während sich der Befund in den GR<sup>flox</sup>-Mäusen zu Tag 12 bereits besserte, blieb er hingegen in den GR<sup>lysM</sup>-Mäusen unverändert. Die verkürzte Colonlänge als Symptom der intestinalen Entzündung veränderte sich von Tag 10 zu Tag 12 allerdings in beiden Gruppen nicht. Ein Erklärungsansatz hierfür wäre, dass die Rückbildung mehr Zeit in Anspruch nehmen könnte. Eindeutige Beweise oder Beschreibungen in der Literatur gibt es jedoch nicht. Die hier nachgewiesenen Gewebeschäden korrelieren mit den bereits in vielen Arbeiten gezeigten charakteristischen histopathologischen Befunden sowohl bei Colitis Ulcerosa Patienten (Dinallo et al. 2019; Porter et al. 2020), als auch in tierexperimentellen Modellen (Okayasu et al. 1990; Wirtz et al. 2017).

In den Gewebeschnitten der behandelten Tiere zeigten sich in der Lamina propria ausgeprägte leukozytäre Infiltrate. Zur Differenzierung dieser wurden immunhistologische Untersuchungen angeschlossen. In früheren Publikationen konnte gezeigt werden, dass diese sich überwiegend aus Makrophagen zusammensetzen (Stevceva et al. 2001). Nach initialer Einwanderung von neutrophilen Granulozyten werden die Makrophagen in großen Mengen angelockt und durch pro-inflammatorische Zytokine zu einer Entzündungsreaktion angeregt (Porter et al. 2020). Bereits in den unbehandelten Kontrollgruppen überwog die Anzahl der Makrophagen, durch die Behandlung kam es jedoch zu einer ausgeprägten Infiltration durch weitere Immunzellen in das Colongewebe. Auch hier waren in der Mehrzahl Makrophagen nachweisbar. Die feinere Analyse mittels FACS (Durchflusszytometrie, *fluorescence activated cell sorting*), die nach Abschluss dieser Dissertation durchgeführt wurde, erlaubte eine genauere

Quantifizierung der Immunzellen in den Infiltraten (Meers et al. 2018). Hierbei zeigte sich, dass die Zahl der neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und T-Zellen am Tag 12 nach DSS-Behandlung stark zunimmt. In Übereinstimmung mit den immunhistochemischen Daten waren die Makrophagen die dabei vorherrschende Zellpopulation im entzündlichen Infiltrat und überwogen bei GR<sup>lysM</sup>-Mäusen signifikant im Vergleich zu GR<sup>flox</sup>-Mäusen. Eine vermehrte Migration der Immunzellen, insbesondere der Makrophagen, durch pro-inflammatorische Signale während der Entzündungsreaktion wurde durch weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe (Meers et al. 2018) sowie Arbeiten anderer Autoren somit bestätigt. (Friedrich et al. 2019; Porter et al. 2020).

#### 4.4 Zytokinmilieu im Rahmen der Entzündungs- und Rekonvaleszenzphase

Ein wichtiger Bestandteil der Immunreaktion ist die Ausschüttung von unterschiedlichen Zytokinen mit zum Teil pro- oder anti-inflammatorischer Wirkung. In anderen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Mäuse, denen der GR in myeloischen Zellen fehlt (GR<sup>lysM</sup>-Mäuse), nicht in der Lage sind pro-inflammatorische Zytokine zu regulieren und damit zu systemischen Entzündungen neigen (Kleiman et al. 2012; Vettorazzi et al. 2015). Die Untersuchung der IL-6 Serumspiegel im vorliegenden Modell zeigte, dass diese auch im Rahmen einer intestinalen Entzündungsreaktion erhöht sind. Während die systemische Konzentration von IL-6 von Tag 10 zu Tag 12 in den GR<sup>flox</sup>-Mäusen wieder stark abnahm., blieb er in den GR<sup>lysM</sup>-Mäusen hingegen auf gleichem Niveau erhöht. Die fehlende Erholung der GR<sup>lysM</sup>-Mäuse nach Absetzen der Noxen deutet demnach unter anderem auf eine Unfähigkeit hin, die IL-6-Sekretion zu kontrollieren bzw. herunterzuregulieren. Hohe IL-6-Spiegel wurden auch im Serum und in Gewebeproben von Menschen mit einem Schub einer Colitis Ulcerosa gefunden (Gross et al. 1992), sodass hieraus auch bereits therapeutische Ansätze abgeleitet wurden (Yamamoto et al. 2000).

Zur genaueren lokalen Beurteilung des lokalen Zytokinmilieus wurde das Darmgewebe auf die Expression verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Gene untersucht. Für die Expression von TNF- $\alpha$  zeigten sich während der Induktion erhöhte Werte, die an Tag 12 wieder absanken, die Veränderungen waren in beiden Gruppen gleich. Die Expression von iNOS war nicht relevant verändert. Allerdings stiegen die Spiegel von IL-1 $\beta$  und IL-6 in den GR<sup>lysM</sup>-Mäusen an Tag 10 deutlich stärker an. In den GR<sup>flox</sup>-Mäusen zeigte sich der IL-6-Spiegel von Tag 10 zu Tag 12 rückläufig, während er in den GR<sup>lysM</sup>-Mäusen erhöht blieb. Frühere Untersuchungen ergaben bereits, dass die Neigung zu ausgeprägten systemischen Infektionen insbesondere durch das Unvermögen IL-1 $\beta$  und IL-6 zu unterdrücken bedingt ist, der TNF- $\alpha$ -Spiegel hingegen keinen Einfluss hat (Kleiman et al. 2012). Andere Arbeiten wiederum zeigten jedoch, dass TNF- $\alpha$  einen Einfluss auf die Permeabilität der Darmbarriere hat (Prasad et al. 2005) und Makrophagen zum M1-Phänotyp polarisiert (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass

der TNF- $\alpha$ -Spiegel mehr Einfluss auf die Entzündungsentwicklung und weniger auf die Rekonvaleszenz hat und damit zu den gewählten Messzeitpunkten keine Unterschiede aufweist.

Die M2-Polarisation der Makrophagen als Ausdruck anti-inflammatorischer Prozesse wurde auf Basis der mittels Expression der beiden Scavenger-Rezeptoren CD163 und CD206, sowie des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 untersucht. Es zeigte sich, dass diese ausschließlich in den GR<sup>flox</sup>-Mäusen nicht jedoch in den GR<sup>lysM</sup>-Mäusen hochreguliert wurden. Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Glukokortikoide die Immunreaktion durch die Induktion von M2-Genen hemmen und damit Gewebereparaturmechanismen verstärken (Martinez et al. 2008). Ebenso wurde übereinstimmend in einem Mausmodell der Multiplen Sklerose nachgewiesen, dass die Dysregulation von CD163, CD206 und IL-10 die Auflösung der Entzündungsreaktion beeinflusst (Schweingruber et al. 2011). Die Expression von iNOS zeigte keine relevanten Unterschiede, die von Arg-1 wurde in beiden Gruppen an Tag 10 in ähnlicher Weise hoch- und an Tag 12 wieder herunterreguliert. Dies steht im Gegensatz zu früheren Erkenntnissen bei Untersuchungen in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (Schweingruber et al. 2011; Montes-Cobos et al. 2017a).

Mäusen auf Balb/C-Hintergrund zeigten den gleichen Krankheitsverlauf wie C57/Bl6-Mäusen. Die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine war ebenso in beiden Gruppen an Tag 10 erhöht. Interessanterweise ließen sich in beiden Gruppen an Tag 10 erhöhte Werte auch für iNOS nachweisen. Arg-1 zeigte die Tendenz zu einer höheren Expression in den GR<sup>flox</sup>-Mäusen jedoch ohne Signifikanz. Entsprechend vorherigen Untersuchungen wäre durch die Th-2-Polarisation in BalbC-Mäusen eine Hochregulation von Arg-1 zu erwarten (Modolell et al. 1995). Die weniger ausgeprägte Expression in den GR<sup>lysM</sup>-Mäusen spricht ebenfalls für eine Unterrepräsentation von M2-Makrophagen.

Insgesamt sind für die weiterhin hohe Entzündungsaktivität in GR<sup>lysM</sup>-Mäusen die höheren pro-inflammatorische Zytokinspiegel und eine höhere Anzahl von Makrophagen vom M1-Phänotyp verantwortlich. Dies konnte bereits für andere menschliche Erkrankungen und die experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis nachgewiesen werden (Wynn et al. 2013; Jiang et al. 2014). Makrophagen vom M2-Phänotyp, die für die Reparaturmechanismen und Wiedereinstellung der Immunostase verantwortlich sind, scheinen unterrepräsentiert zu sein und werden durch die fehlende Expression von Induktoren nicht ausreichend aktiviert. Zusammenfassend führt die GR-Ablation in myeloischen Zellen somit zu einer veränderten Makrophagen-Polarisation hin zum M1-Phänotyp und damit zu einer mangelhaften Gewebereparatur der durch die DSS-induzierte Colitis verursachten Schäden.

## 4.5 Einfluss von Glukokortikoiden auf die Entzündung und Gewebereparatur, therapeutische Ansätze

Die Gabe von Glukokortikoiden ist weiterhin eine der Hauptsäulen in der Therapie von Schüben einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung, ungeachtet dessen, dass ein effizientes Langzeitsprechen nur bei einem Teil der Patienten zu verzeichnen ist. 40 % der Betroffenen reagieren mit Remission auf die Therapie und können im Verlauf auf eine Schubprophylaxe umgestellt werden. Weitere 40 – 50 % leiden unter steroidrefraktären Schüben und können nicht ohne erneutes Aufflammen des Schubes von Glukokortikoiden entwöhnt werden. 10 – 20 % der Betroffenen reagieren gar nicht mehr adäquat auf die Wirkung von Glukokortikoiden. In diesen Fällen werden dann komplexe immunmodulatorische Behandlungsstrategien notwendig (Kucharzik et al. 2020a). Der Nachweis einer Assoziation zwischen Mukosaheilung und dem Erreichen einer steroidfreien Remission (Reinink et al. 2016; Shah et al. 2016) macht gezieltere Therapien durch ein besseres Verständnis des Pathomechanismus noch relevanter. Zudem wird der GR in allen Zelltypen exprimiert. Dies ist eine der Hauptursachen für die umfangreiche Wirkung aber auch Nebenwirkungen von Glukokortikoiden, die insbesondere bei Gabe hoher Dosen und/oder über lange Zeiträume sich verschlimmern. Daher ist eine strenge Risiko-Nutzen-Abwägung notwendig (Schäcke et al. 2004; Pithadia und Jain 2011; Buttgerit et al. 2015; Kucharzik et al. 2020a). Der Versuch die Glukokortikoide mittels spezieller Trägersysteme nur in bestimmten Zielzellen wirken zu lassen, wurde experimentell bereits vielfach unternommen. Verschiedene Nanoformulierungen wie (PEGylierte) Liposome, polymere Mizellen, Polymer-Wirkstoff-Konjugate, anorganische Wirkstoff-Transport-Systeme und anorganisch-organische Hybride-Nanopartikel wurden erprobt (Lühder und Reichardt 2017; Wakaskar 2018). In einem Mausmodell für Multiple Sklerose konnte durch die Gabe von Betametonhaltigen anorganisch-organischen Hybrid-Nanopartikeln, die bevorzugt von Makrophagen aufgenommen wurden, gezeigt werden, dass die therapeutische Wirkung nur von der Modulation der Makrophagen und hingegen nicht der T-Zellen oder Hirnendothelzellen abhing. Auch isolierte humane Monozyten reagierten auf solche Betametonhaltigen anorganisch-organischen Hybrid-Nanopartikeln, wodurch dies ein zellspezifischer Therapieansatz zu sein scheint, um über andere Zellen vermittelte Nebenwirkungen zu reduzieren (Montes-Cobos et al. 2017b). Eine weitere Publikation beschreibt ein anti-CD163-Antikörper-Wirkstoff-Konjugat. Hier wurde das Glukokortikoid Dexamethason an einen Antikörper gekoppelt, der spezifisch an den Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor CD163 auf Makrophagen, vor allem des M2-Phänotyps, bindet. In in-vivo-Versuchen mit Ratten belegen eine etwa 50-mal höhere Wirkung auf Makrophagen des konjugierten Dexamethason im Vergleich zum unkonjugierten Wirkstoff. Während die systemische Wirkung von freien Dexamethason stark ausfiel, hatte die äquivalente Dosis des Konjugats aber keine derartige Wirkung (Graversen et al. 2012). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit demselben Antikörper in einem Ratten-Model der Fruktose-induzierten Leberentzündung gewonnen. Das niedrig dosierte anti-CD163-IgG-

Dexamethason-Konjugat reduzierte die entsprechenden Entzündungsreaktionen und zeigte keine offensichtlichen systemischen Nebenwirkungen (Svendsen et al. 2017). Auch für die DSS-induzierte Colitis als Modell für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen konnten bereits ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Die einmalige Injektion eines makromolekularen Prodrugs von Dexamethason mit einer  $\frac{1}{4}$ -äquivalenten Dexamethason-Dosis hatte im Vergleich eine bessere therapeutische Wirkung als eine tägliche Behandlung mit freiem Dexamethason (Ren et al. 2015). In einer Untersuchung an aseptischer Implantatlockerung konnte gezeigt werden, dass das zuvor genannte Molekül ebenso wirksam wie freies Dexamethason war, der systemische Knochenverlust, eine der Hauptnebenwirkung von Glukokortikoiden, aber ausblieb (Ren et al. 2014). Makrophagen sind demnach als Ziel von Nanoformulierungen sehr geeignet. In Kombination mit der Erkenntnis dieser Arbeit, dass Makrophagen wichtige Zielzellen von Glukokortikoiden bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sind, ergeben Ansätze mit zielzellspezifisch-wirkenden Glukokortikoiden neue Strategien zur Verbesserung der Therapie von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.

Unerwarteter Weise wurde beobachtet, dass mit Dexamethason beladene lang zirkulierenden Liposome, die in einem Mausmodell der Multiplen Sklerose positive Effekte hatten, die Krankheitsaktivität in einer chronischen DSS-induzierten Colitis verstärkten. Als Erklärung wurde der durch Veränderung der Makrophagen zum M2-Phänotyp reduzierte Schutz vor eindringenden Mikroorganismen und damit verstärkten intestinalen Entzündung postuliert (Crielaard et al. 2011). Schon deutlich früher wurde nachgewiesen, dass freies Dexamethason die Krankheitsausprägung einer akuten DSS-induzierten Colitis verschlimmert, während es die Symptome bei einer chronischen DSS-induzierten Colitis mildert (Kojouharoff et al. 1997). Dies steht im Gegensatz zu den Erkenntnissen der liposomalen Dexamethason Formulierung. Weitere Untersuchungen mit anderen Transportsystemen sind sicherlich sinnvoll, sollten jedoch aufgrund der angeführte Einschränkungen und gegensätzlichen Wirkungen von einzelnen Glukokortikoiden bevorzugt in einem chronischen Colitis-Modell durchgeführt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Glukokortikoide die Anzahl, die Aktivität und den Phänotyp myeloischer Zellen, im speziellen von Makrophagen im Colon beeinflussen und damit zur Regeneration der intestinalen Entzündung beitragen. Damit ist ihre gezielte Ansteuerung durch zelltypspezifische Carriersysteme ein erfolgsversprechender therapeutischer Ansatz, um nebenwirkungsarme Therapeutika für die Remissionsinduktion zu entwickeln.

## 5 Zusammenfassung

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie die Colitis Ulcerosa sind weit verbreitete Erkrankungen, die durch Symptome wie Bauchschmerzen, Durchfall und Gewichtsverlust eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität der Betroffenen mit sich bringen. Zudem steigt mit der Krankheitsaktivität über die Zeit hinweg auch das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Die Gabe von Glukokortikoiden ist eine der Standardtherapien von Colitis Ulcerosa, insbesondere zur Schubbehandlung. Obgleich ein nicht unerheblicher Teil der Betroffenen von dieser Therapie nicht mehr entwöhnt werden kann oder gar nicht darauf reagiert, mangelt es an gleichwertigen Alternativen. Die ausgeprägten Nebenwirkungen einer Glukokortikoid-Dauertherapie wie beispielsweise Osteoporose, Hyperglykämie und gastrale Ulcera, sind ein weiterer erschwerender Gesichtspunkt in Bezug auf die therapeutischen Möglichkeiten. Neue Untersuchungen, die zu einer Verbesserung der Therapiemöglichkeiten beitragen könnten, sind daher dringend erforderlich.

Das Mausmodell der DSS-induzierten Colitis ähnelt in ihrer histopathologischen Ausprägung dem Schub einer Colitis Ulcerosa. Mäuse, denen der Glukokortikoid-Rezeptor in myeloischen Zellen fehlt ( $GR^{lysM}$ ) und die damit nicht mehr auf die Wirkung von Glukokortikoiden reagieren können, blieben in diesem Modell nach Beendigung der Noxe weiterhin krank. Die Kontrollgruppe ( $GR^{lox}$ ) erkrankte zwar vergleichbar, erholte sich nach Beendigung der DSS-Gabe aber wieder. Die Krankheitsausprägung wurde anhand klinischer Symptome bewertet was durch Bestimmung der Colonalänge und dem histopathologischen Befund ergänzt wurde.  $GR^{lysM}$ -Mäuse wiesen eine höhere Anzahl von Makrophagen in den entzündlichen Infiltraten des Dickdarms auf, während die Anzahl von neutrophilen Granulozyten und T-Zellen kaum verändert war. Weiterhin zeigten  $GR^{lysM}$ -Mäuse auch in der Remission hohe IL-6 Serumspiegel. Während die Expression pro-inflammatorischer Zytokine im Colongewebe ebenfalls erhöht war, wurde gleichzeitig eine gestörte Induktion anti-inflammatorischer Zytokine in den  $GR^{lysM}$ -Mäusen beobachtet.

Mit den vorliegenden Daten konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des Glukokortikoid-Rezeptors in myeloischen Zellen die Auflösung der Entzündungsreaktion beeinträchtigt. Die persistierenden klinischen Symptome und Gewebeschäden deuten darauf hin, dass die Migration und Polarisation der infiltrierenden Immunzellen insbesondere der Makrophagen, unter diesen Bedingungen beeinträchtigt ist, und es zu einer Störung der systemischen Zytokinfreisetzung und der lokalen Genexpression von Immunmodulatoren kommt. Obgleich diese Ergebnisse in einem Mausmodell gewonnen wurden, legen Veröffentlichungen nahe, dass Makrophagen in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen beim Menschen ähnlich ursächlich sind. Diese Erkenntnisse schaffen somit neue Lösungsansätze für zielgerichtete Therapien mit einem reduzierten Nebenwirkungsprofil.



## 6 Literaturverzeichnis

Abraham BP, Mehta S, El-Serag HB (2012): Natural history of pediatric-onset inflammatory bowel disease: a systematic review. *J Clin Gastroenterol* 46, 581–589

Abraham C, Cho JH (2009): Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 361, 2066–2078

Abreu MT (2010): Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 10, 131–144

Alinaghi F, Tekin HG, Burisch J, Wu JJ, Thyssen JP, Egeberg A (2020): Global Prevalence and Bidirectional Association Between Psoriasis and Inflammatory Bowel Disease—A Systematic Review and Meta-analysis. *J Crohns Colitis* 14, 351–360

Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA, Rieder MJ (1996): Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol* 60, 563–572

AlSharari SD, Akbarali HI, Abdullah RA, Shahab O, Auttachoat W, Ferreira GA, White KL, Lichtman AH, Cabral GA, Damaj MI (2013): Novel Insights on the Effect of Nicotine in a Murine Colitis Model. *J Pharmacol Exp Ther* 344, 207–217

Ananthkrishnan AN (2015): Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12, 205–217

Angelidou I, Chrysanthopoulou A, Mitsios A, Arelaki S, Arampatzioglou A, Kambas K, Ritis D, Tsironidou V, Moschos I, Dalla V, et al. (2018): REDD1/Autophagy Pathway Is Associated with Neutrophil-Driven IL-1 $\beta$  Inflammatory Response in Active Ulcerative Colitis. *J Immunol* 200, 3950–3961

Annese V, Daperno M, Rutter MD, Amiot A, Bossuyt P, East J, Ferrante M, Götz M, Katsanos KH, Kießlich R, et al. (2013): European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 7, 982–1018

Aranda CJ, Arredondo-Amador M, Ocón B, Lavín JL, Aransay AM, Martínez-Augustín O, Sánchez de Medina F (2019): Intestinal epithelial deletion of the glucocorticoid receptor NR3C1 alters expression of inflammatory mediators and barrier function. *FASEB J* 33, 14067–14082

Ayrolidi E, Cannarile L, Migliorati G, Nocentini G, Delfino DV, Riccardi C (2012): Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *FASEB J* 26, 4805–4820

Ballegeer M, Looveren KV, Timmermans S, Eggermont M, Vandevyver S, Thery F, Dendoncker K, Souffriau J, Vandewalle J, Wyngene LV, et al. (2018): Glucocorticoid receptor dimers control intestinal STAT1 and TNF-induced inflammation in mice. *J Clin Invest* 128, 3265–3279

Barnes PJ (2011): Glucocorticosteroids: current and future directions. *Br J Pharmacol* 163,

29–43

Beato M, Sánchez-Pacheco A (1996): Interaction of Steroid Hormone Receptors with the Transcription Initiation Complex. *Endocr Rev* 17, 587–609

Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, McKee DD, Consler TG, Parks DJ, Stewart EL, Willson TM, et al. (2002): Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* 110, 93–105

Bouguen G, Dubuquoy L, Desreumaux P, Brunner T, Bertin B (2015): Intestinal steroidogenesis. *Steroids* 103, 64–71

Bouma G, Strober W (2003): The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 3, 521–533

Burisch J, Pedersen N, Čuković-Čavka S, Brinar M, Kaimakliotis I, Duricova D, Shonová O, Vind I, Avnstrøm S, Thorsgaard N, et al. (2014): East–West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCO-EpiCom inception cohort. *Gut* 63, 588–597

Buttgereit F, Spies CM, Bijlsma JWJ (2015): Novel glucocorticoids: where are we now and where do we want to go? *Clin Exp Rheumatol* 33(4), 29–33

Caltabiano C, Máximo FR, Spadari APP, da Conceição Miranda DD, Serra MMP, Ribeiro ML, Martinez CAR (2011): 5-aminosalicylic acid (5-ASA) can reduce levels of oxidative DNA damage in cells of colonic mucosa with and without fecal stream. *Dig Dis Sci* 56, 1037–1046

Cannon AR, Akhtar S, Hammer AM, Morris NL, Javorski MJ, Li X, Kennedy RH, Gamelli RL, Choudhry MA (2016): Effects of Mesalamine Treatment on Gut Barrier Integrity After Burn Injury. *J Burn Care Res* 37, 283–292

Cato ACB, Nestl A, Mink S (2002): Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE* 2002(138), re9

Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, Poole AC, Srinivasan S, Ley RE, Gewirtz AT (2015): Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 519, 92–96

Chiriac MT, Buchen B, Wandersee A, Hundorfean G, Günther C, Bourjau Y, Doyle SE, Frey B, Ekici AB, Büttner C, et al. (2017): Activation of Epithelial Signal Transducer and Activator of Transcription 1 by Interleukin 28 Controls Mucosal Healing in Mice With Colitis and Is Increased in Mucosa of Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 153(1), 123-138.e8

Cima I, Corazza N, Dick B, Fuhrer A, Herren S, Jakob S, Ayuni E, Mueller C, Brunner T (2004): Intestinal Epithelial Cells Synthesize Glucocorticoids and Regulate T Cell Activation. *J Exp Med* 200, 1635–1646

- Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Förster I (1999): Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* **8**, 265–277
- Coskun M (2014): Intestinal Epithelium in Inflammatory Bowel Disease. *Front Med (Lausanne)* **1**, 24
- Costello SP, Hughes PA, Waters O, Bryant RV, Vincent AD, Blatchford P, Katsikeros R, Makanyanga J, Campaniello MA, Mavrangelos C, et al. (2019): Effect of Fecal Microbiota Transplantation on 8-Week Remission in Patients With Ulcerative Colitis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **321**, 156–164
- Crielaard BJ, Lammers T, Morgan ME, Chaabane L, Carboni S, Greco B, Zaratin P, Kraneveld AD, Storm G (2011): Macrophages and liposomes in inflammatory disease: Friends or foes? *Int J Pharm* **416**, 499–506
- Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD (1932): Regional Ileitis: a pathologic an clinical entity. *JAMA* **99**, 1323–1329
- Cross M, Mangelsdorf I, Wedel A, Renkawitz R (1988): Mouse lysozyme M gene: isolation, characterization, and expression studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6232–6236
- Cruz-Topete D, Cidowski JA (2015): One Hormone Two Actions: Anti- and Pro-inflammatory Effects of Glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* **22**, 20–32
- D’Adamio F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, Cannarile L, Migliorati G, Riccardi C (1997): A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* **7**, 803–812
- Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA (1993): Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* **259**, 1739–1742
- Danese S, Fiocchi C (2011): Ulcerative colitis. *N Engl J Med* **365(18)**, 1713–1725
- Danese S, Rudziński J, Brandt W, Dupas J-L, Peyrin-Biroulet L, Bouhnik Y, Kleczkowski D, Uebel P, Lukas M, Knutsson M, et al. (2015): Tralokinumab for moderate-to-severe UC: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase IIa study. *Gut* **64**, 243–249
- De Bosscher K, Haegeman G (2009): Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* **23**, 281–291
- Dejaco C, Oesterreicher C, Angelberger S, Püspök A, Birner P, Poetzi R, Gangl A, Oberhuber G (2003): Diagnosing colitis: a prospective study on essential parameters for reaching a diagnosis. *Endoscopy* **35**, 1004–1008
- Deroo BJ, Archer TK (2001): Glucocorticoid receptor activation of the I kappa B alpha promoter within chromatin. *Mol Biol Cell* **12**, 3365–3374
- Desreumaux P, Foussat A, Allez M, Beaugerie L, Hébuterne X, Bouhnik Y, Nachury M,

- Brun V, Bastian H, Belmonte N, et al. (2012): Safety and efficacy of antigen-specific regulatory T-cell therapy for patients with refractory Crohn's disease. *Gastroenterology* 143(5), 1207-1217.e2
- D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L, Geens P, Iwens D, Aerden I, Van Assche G, et al. (2012): Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 18, 2218–2224
- Diaz-Jimenez D, Kolb JP, Cidlowski JA (2021): Glucocorticoids as Regulators of Macrophage-Mediated Tissue Homeostasis. *Front Immunol* 12, 1892
- Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO (1994): Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 107, 1643–1652
- Dinallo V, Marafini I, Di Fusco D, Laudisi F, Franzè E, Di Grazia A, Figliuzzi MM, Caprioli F, Stolfi C, Monteleone I, Monteleone G (2019): Neutrophil Extracellular Traps Sustain Inflammatory Signals in Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis* 13, 772–784
- Do A, Reid RC, Lohman R-J, Sweet MJ, Fairlie DP, Iyer A (2017): An HDAC6 Inhibitor Confers Protection and Selectively Inhibits B-Cell Infiltration in DSS-Induced Colitis in Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 360, 140–151
- Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, et al. (2006): A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314, 1461–1463
- Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ (2014): Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 41, 21–35
- Escoter-Torres L, Caratti G, Mechtidou A, Tuckermann J, Uhlenhaut NH, Vettorazzi S (2019): Fighting the Fire: Mechanisms of Inflammatory Gene Regulation by the Glucocorticoid Receptor. *Front Immunol* 10, 1859
- Exner C, Limbach C, Heldmaier G, Deutsche Forschungsgemeinschaft (Hrsg.): *Tierversuche in der Forschung*. Stand: 01.02.2016; DFG, Bonn 2016
- Fantini MC, Becker C, Tubbe I, Nikolaev A, Lehr HA, Galle P, Neurath MF (2006): Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut* 55, 671–680
- Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, Hanauer S, Colombel J-F, Sandborn WJ, Van Assche G, Axler J, Kim H-J, Danese S, et al. (2013): Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 369, 699–710
- Freedman ND, Yamamoto KR (2004): Importin 7 and Importin  $\alpha$ /Importin  $\beta$  are Nuclear Import Receptors for the Glucocorticoid Receptor. *Mol Biol Cell* 15, 2276–2286
- Friedrich M, Pohin M, Powrie F (2019): Cytokine Networks in the Pathophysiology of

Inflammatory Bowel Disease. *Immunity* 50, 992–1006

Furey TS, Sethupathy P, Sheikh SZ (2019): Redefining the IBDs using genome-scale molecular phenotyping. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16, 296–311

Gagliani N, Vesely MCA, Iseppon A, Brockmann L, Xu H, Palm NW, de Zoete MR, Licona-Limón P, Paiva RS, Ching T, et al. (2015): T<sub>H</sub> 17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* 523, 221–225

Glotzer DJ, Glick ME, Goldman H (1981): Proctitis and colitis following diversion of the fecal stream. *Gastroenterology* 80, 438–441

Gordon S (2003): Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23–35

Gordon S, Martinez FO (2010): Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* 32, 593–604

Goyette P, Boucher G, Mallon D, Ellinghaus E, Jostins L, Huang H, Ripke S, Gusareva ES, Annese V, Hauser SL, et al. (2015): High-density mapping of the MHC identifies a shared role for HLA-DRB1\*01:03 in inflammatory bowel diseases and heterozygous advantage in ulcerative colitis. *Nat Genet* 47, 172–179

Graham DB, Luo C, O’Connell DJ, Lefkovich A, Brown EM, Yassour M, Varma M, Abelin JG, Conway KL, Jasso GJ, et al. (2018): Antigen discovery and specification of immunodominance hierarchies for MHCII-restricted epitopes. *Nat Med* 24, 1762–1772

Graversen JH, Svendsen P, Dagnæs-Hansen F, Dal J, Anton G, Etzerodt A, Petersen MD, Christensen PA, Møller HJ, Moestrup SK (2012): Targeting the hemoglobin scavenger receptor CD163 in macrophages highly increases the anti-inflammatory potency of dexamethasone. *Mol Ther* 20, 1550–1558

Griseri T, Asquith M, Thompson C, Powrie F (2010): OX40 is required for regulatory T cell-mediated control of colitis. *J Exp Med* 207, 699–709

Gross V, Andus T, Caesar I, Roth M, Schölmerich J (1992): Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn’s disease. *Gastroenterology* 102, 514–519

Halfvarson J, Jess T, Magnuson A, Montgomery SM, Orholm M, Tysk C, Binder V, Järnerot G (2006): Environmental factors in inflammatory bowel disease: a co-twin control study of a Swedish-Danish twin population. *Inflamm Bowel Dis* 12, 925–933

Hanash AM, Dudakov JA, Hua G, O’Connor MH, Young LF, Singer NV, West ML, Jenq RR, Holland AM, Kappel LW, et al. (2012): Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* 37, 339–350

Hebbar PB, Archer TK (2003): Chromatin remodeling by nuclear receptors. *Chromosoma* 111, 495–504

- Heinsbroek SEM, Gordon S (2009): The role of macrophages in inflammatory bowel diseases. *Expert Mol Med Rev* 11, e14
- Heller F, Fromm A, Gitter AH, Mankertz J, Schulzke J-D (2008): Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. *Mucosal Immunol* 1, 58–61
- Hernández-Chirlaque C, Aranda CJ, Ocón B, Capitán-Cañadas F, Ortega-González M, Carrero JJ, Suárez MD, Zarzuelo A, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustin O (2016): Germ-free and Antibiotic-treated Mice are Highly Susceptible to Epithelial Injury in DSS Colitis. *J Crohns Colitis* 10, 1324–1335
- Hudcovic T, Stěpánková R, Cebra J, Tlaskalová-Hogenová H (2001): The role of microflora in the development of intestinal inflammation: acute and chronic colitis induced by dextran sulfate in germ-free and conventionally reared immunocompetent and immunodeficient mice. *Folia Microbiol (Praha)* 46, 565–572
- Huys L, Van Hauwermeiren F, Dejager L, Dejonckheere E, Lienenklaus S, Weiss S, Leclercq G, Libert C (2009): Type I interferon drives tumor necrosis factor-induced lethal shock. *J Exp Med* 206, 1873–1882
- Imdad A, Nicholson MR, Tanner-Smith EE, Zackular JP, Gomez-Duarte OG, Beaulieu DB, Acra S (2018): Fecal transplantation for treatment of inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst Rev* 11, CD012774
- Jenkins D, Balsitis M, Gallivan S, Dixon MF, Gilmour HM, Shepherd NA, Theodossi A, Williams GT (1997): Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. The British Society of Gastroenterology Initiative. *J Clin Pathol* 50, 93–105
- Jiang Z, Jiang JX, Zhang G-X (2014): Macrophages: a double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Lett* 160, 17–22
- Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Philip Schumm L, Sharma Y, Anderson CA, et al. (2012): Host–microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491, 119–124
- Joyce DA, Steer JH, Abraham LJ (1997): Glucocorticoid modulation of human monocyte/macrophage function: control of TNF-alpha secretion. *Inflamm Res* 46, 447–451
- Kadmiel M, Cidłowski JA (2013): Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 34, 518–530
- Kalla R, Kennedy NA, Ventham NT, Boyapati RK, Adams AT, Nimmo ER, Visconti MR, Drummond H, Ho G-T, Pattenden RJ, et al. (2016): Serum Calprotectin: A Novel Diagnostic and Prognostic Marker in Inflammatory Bowel Diseases. *Am J Gastroenterol* 111, 1796–1805

- Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, Sakuraba A, Kitazume MT, Sugita A, Koganei K, et al. (2008): Unique CD14<sup>+</sup> intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- $\gamma$  axis. *J Clin Invest* 118, 2269–2280
- Kerr T, Ciorba M, Matsumoto H, Davis V, Luo J, Kennedy S, Xie Y, Shaker A, Dieckgraefe B, Davidson N (2012): Dextran Sodium Sulfate Inhibition of Real-Time PCR Amplification: A Poly-A Purification Solution. *Inflamm Bowel Dis* 18, 344–348
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010): Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* 8, e1000412
- Kleiman A, Hübner S, Parkitna JMR, Neumann A, Hofer S, Weigand MA, Bauer M, Schmid W, Schütz G, Libert C, et al. (2012): Glucocorticoid receptor dimerization is required for survival in septic shock via suppression of interleukin-1 in macrophages. *FASEB J* 26, 722–729
- Klein A, Eliakim R (2010): Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Inflammatory Bowel Disease. *Pharmaceuticals (Basel)* 3, 1084–1092
- Kleinert H, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Förstermann U (1996): Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol Pharmacol* 49, 15–21
- Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, et al. (2008): IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 57, 1682–1689
- Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, Männel DN, Andus T, Schölmerich J, Gross V, Falk W (1997): Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 107, 353–358
- Kosmidou M, Katsanos AH, Katsanos KH, Kyritsis AP, Tsivgoulis G, Christodoulou D, Giannopoulos S (2017): Multiple sclerosis and inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol* 264, 254–259
- Kucharzik T, Dignass AU, Atreya R, Bokemeyer B, Esters P, Herrlinger K, Kannengießer K, Kienle P, Langhorst J, Lügering A, et al. (2020a): Aktualisierte S3-Leitlinie Colitis ulcerosa – Living Guideline. *Z Gastroenterol* 58(12), e241–e326
- Kucharzik T, Koletzko S, Kannengießer K, Dignaß A (2020b): Ulcerative Colitis—Diagnostic and Therapeutic Algorithms. *Dtsch Arztebl Int* 117(33–34), 564–574
- Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V (1994): Course of ulcerative colitis: Analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology* 107, 3–11

- Lee H-S, Cleynen I (2019): Molecular Profiling of Inflammatory Bowel Disease: Is It Ready for Use in Clinical Decision-Making? *Cells* 8(6), 535
- Limbourg FP, Huang Z, Plumier J-C, Simoncini T, Fujioka M, Tuckermann J, Schütz G, Moskowitz MA, Liao JK (2002): Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids. *J Clin Invest* 110, 1729–1738
- Lin J-F, Chen J-M, Zuo J-H, Yu A, Xiao Z-J, Deng F-H, Nie B, Jiang B (2014): Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity. *Inflamm Bowel Dis* 20, 1407–1415
- Linskens RK, Mallant-Hent RC, Groothuisink ZMA, Bakker-Jonges LE, van de Merwe JP, Hooijkaas H, von Blomberg BME, Meuwissen SGM (2002): Evaluation of serological markers to differentiate between ulcerative colitis and Crohn's disease: pANCA, ASCA and agglutinating antibodies to anaerobic coccoid rods. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 14, 1013–1018
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25, 402–408
- Lloyd-Price J, Arze C, Ananthakrishnan AN, Schirmer M, Avila-Pacheco J, Poon TW, Andrews E, Ajami NJ, Bonham KS, Brislawn CJ, et al. (2019): Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature* 569, 655–662
- Lühder F, Reichardt HM (2017): Novel Drug Delivery Systems Tailored for Improved Administration of Glucocorticoids. *Int J Mol Sci* 18(9), 1836
- Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB (1991): Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352, 497–505
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677–686
- Marteau P, Probert CS, Lindgren S, Gassul M, Tan TG, Dignass A, Befrits R, Midhagen G, Rademaker J, Foldager M (2005): Combined oral and enema treatment with Pentasa (mesalazine) is superior to oral therapy alone in patients with extensive mild/moderate active ulcerative colitis: a randomised, double blind, placebo controlled study. *Gut* 54, 960–965
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M (2008): Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13, 453–461
- McCauley HA, Guasch G (2015): Three cheers for the goblet cell: maintaining homeostasis in mucosal epithelia. *Trends in Molecular Medicine* 21, 492–503
- McKay LI, Cidlowski JA (1999): Molecular Control of Immune/Inflammatory Responses:



- Interactions Between Nuclear Factor- $\kappa$ B and Steroid Receptor-Signaling Pathways. *Endocr Rev* 20, 435–459
- McLoughlin RM, O’Morain CA (2006): Colorectal cancer screening. *World J Gastroenterol* 12, 6747–6750
- Medina-Contreras O, Harusato A, Nishio H, Flannigan KL, Ngo V, Leoni G, Neumann P-A, Geem D, Lili LN, Ramadas RA, et al. (2016): Cutting Edge: IL-36 Receptor Promotes Resolution of Intestinal Damage. *J Immunol* 196, 34–38
- Meers GK, Bohnenberger H, Reichardt HM, Lühder F, Reichardt SD (2018): Impaired resolution of DSS-induced colitis in mice lacking the glucocorticoid receptor in myeloid cells. *PLoS One* 13, e0190846
- Mehta F (2016): Report: economic implications of inflammatory bowel disease and its management. *Am J Manag Care* 22, s51-60
- Moayyedi P, Surette MG, Kim PT, Libertucci J, Wolfe M, Onischi C, Armstrong D, Marshall JK, Kassam Z, Reinisch W, Lee CH (2015): Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* 149, 102-109.e6
- Modolell M, Corraliza I, Link F, Soler G, Eichmann K (1995): Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol* 25
- Montes-Cobos E, Schweingruber N, Li X, Fischer HJ, Reichardt HM, Lühder F (2017a): Deletion of the Mineralocorticoid Receptor in Myeloid Cells Attenuates Central Nervous System Autoimmunity. *Front Immunol* 8, 1319
- Montes-Cobos E, Ring S, Fischer HJ, Heck J, Strauß J, Schwaninger M, Reichardt SD, Feldmann C, Lühder F, Reichardt HM (2017b): Targeted delivery of glucocorticoids to macrophages in a mouse model of multiple sclerosis using inorganic-organic hybrid nanoparticles. *J Control Release* 245, 157–169
- Mowat AM, Agace WW (2014): Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* 14, 667–685
- Mowat AM, Scott CL, Bain CC (2017): Barrier-tissue macrophages: functional adaptation to environmental challenges. *Nat Med* 23, 1258–1270
- Muzzi C, Watanabe N, Twomey E, Meers GK, Reichardt HM, Bohnenberger H, Reichardt SD (2020): The Glucocorticoid Receptor in Intestinal Epithelial Cells Alleviates Colitis and Associated Colorectal Cancer in Mice. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*
- Na YR, Stakenborg M, Seok SH, Matteoli G (2019): Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16,

531–543

Neurath MF, Travis SPL (2012): Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. *Gut* 61, 1619–1635

Ng SC, Woodrow S, Patel N, Subhani J, Harbord M (2012): Role of genetic and environmental factors in British twins with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 18, 725–736

Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Wu JCY, Chan FKL, et al. (2017): Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet* 390, 2769–2778

Norman JM, Handley SA, Baldridge MT, Droit L, Liu CY, Keller BC, Kambal A, Monaco CL, Zhao G, Fleshner P, et al. (2015): Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* 160, 447–460

Norton JM, Munck A (1980): In vitro actions of glucocorticoids on murine macrophages: effects on glucose transport and metabolism, growth in culture, and protein synthesis. *J Immunol* 125, 259–266

Noti M, Corazza N, Tuffin G, Schoonjans K, Brunner T (2010): Lipopolysaccharide induces intestinal glucocorticoid synthesis in a TNF $\alpha$ -dependent manner. *FASEB J* 24, 1340–1346

Odenwald MA, Turner JR (2017): The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 9–21

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 C, Obermeier F, Thieler S, Kemptner D, Bauer A, Schölmerich J, Rogler G, Timmer A (2008): The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20, 917–923

Ott SJ, Kühbacher T, Musfeldt M, Rosenstiel P, Hellmig S, Rehman A, Drews O, Weichert W, Timmis KN, Schreiber S (2008): Fungi and inflammatory bowel diseases: Alterations of composition and diversity. *Scand J Gastroenterol* 43, 831–841

Paramsothy S, Kamm MA, Kaakoush NO, Walsh AJ, van den Bogaerde J, Samuel D, Leong RWL, Connor S, Ng W, Paramsothy R, et al. (2017): Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 389, 1218–1228

Parente F, Greco S, Molteni M, Cucino C, Maconi G, Sampietro GM, Danelli PG, Cristaldi M, Bianco R, Gallus S, Bianchi Porro G (2003): Role of early ultrasound in detecting inflammatory intestinal disorders and identifying their anatomical location within the bowel.

Aliment Pharmacol Ther 18, 1009–1016

Parente F, Molteni M, Marino B, Colli A, Ardizzone S, Greco S, Sampietro G, Foschi D, Gallus S (2010): Are colonoscopy and bowel ultrasound useful for assessing response to short-term therapy and predicting disease outcome of moderate-to-severe forms of ulcerative colitis?: a prospective study. *Am J Gastroenterol* 105, 1150–1157

Pascu M, Roznowski AB, Müller H-P, Adler A, Wiedenmann B, Dignass AU (2004): Clinical relevance of transabdominal ultrasonography and magnetic resonance imaging in patients with inflammatory bowel disease of the terminal ileum and large bowel. *Inflamm Bowel Dis* 10, 373–382

Perez-Lopez A, Behnsen J, Nuccio S-P, Raffatellu M (2016): Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. *Nat Rev Immunol* 16, 135–148

Perše M, Cerar A (2012): Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks. *J Biomed Biotechnol* 2012

Phillipson M, Kubes P (2011): The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* 17, 1381–1390

Picard D, Yamamoto KR (1987): Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 6, 3333–3340

Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, Lehr H-A, Hirth S, Weigmann B, Wirtz S, et al. (2009): STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med* 206, 1465–1472

Pithadia AB, Jain S (2011): Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol Rep* 63, 629–642

Platt AM, Bain CC, Bordon Y, Sester DP, Mowat AM (2010): An Independent Subset of TLR Expressing CCR2-Dependent Macrophages Promotes Colonic Inflammation. *J Immunol* 184, 6843–6854

Podolsky DK (2002): Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347(6), 417–429

Porta C, Riboldi E, Ippolito A, Sica A (2015): Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. *Semin Immunol* 27, 237–248

Porter RJ, Kalla R, Ho G-T (2020): Ulcerative colitis: Recent advances in the understanding of disease pathogenesis. *F1000Res* 9, 294

Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL, Powell RM, MacDonald TT, Collins JE (2005): Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab Invest* 85, 1139–1162

Pratt WB (1993): The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 268, 21455–21458

- Pratt WB, Toft DO (1997): Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18, 306–360
- Qiu X, Ma J, Jiao C, Mao X, Zhao X, Lu M, Wang K, Zhang H (2017): Alterations in the mucosa-associated fungal microbiota in patients with ulcerative colitis. *Oncotarget* 8, 107577–107588
- Reber SO, Obermeier F, Straub RH, Straub HR, Falk W, Neumann ID (2006): Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration. *Endocrinology* 147, 4968–4976
- Reichardt HM, Tuckermann JP, Göttlicher M, Vujic M, Weih F, Angel P, Herrlich P, Schütz G (2001): Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 20, 7168–7173
- Reinink AR, Lee TC, Higgins PDR (2016): Endoscopic Mucosal Healing Predicts Favorable Clinical Outcomes in Inflammatory Bowel Disease: A Meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 22, 1859–1869
- Reinisch W, Panés J, Khurana S, Toth G, Hua F, Comer GM, Hinz M, Page K, O’Toole M, Moorehead TM, et al. (2015): Anrukizumab, an anti-interleukin 13 monoclonal antibody, in active UC: efficacy and safety from a phase IIa randomised multicentre study. *Gut* 64, 894–900
- Ren K, Dusad A, Yuan F, Yuan H, Purdue PE, Fehringer EV, Garvin KL, Goldring SR, Wang D (2014): Macromolecular prodrug of dexamethasone prevents particle-induced peri-implant osteolysis with reduced systemic side effects. *J Control Release* 175, 1–9
- Ren K, Yuan H, Zhang Y, Wei X, Wang D (2015): Macromolecular glucocorticoid prodrug improves the treatment of dextran sulfate sodium-induced mice ulcerative colitis. *Clin Immunol* 160, 71–81
- Rhen T, Cidlowski JA (2005): Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 353, 1711–1723
- Rivollier A, He J, Kole A, Valatas V, Kelsall BL (2012): Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J Exp Med* 209, 139–155
- Rossen NG, Fuentes S, van der Spek MJ, Tijssen JG, Hartman JHA, Duflou A, Löwenberg M, van den Brink GR, Mathus-Vliegen EMH, de Vos WM, et al. (2015): Findings From a Randomized Controlled Trial of Fecal Transplantation for Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 149(1), 110-118.e4
- Rutter MD, Saunders BP, Wilkinson KH, Rumbles S, Schofield G, Kamm MA, Williams CB, Price AB, Talbot IC, Forbes A (2004): Cancer surveillance in longstanding ulcerative colitis: endoscopic appearances help predict cancer risk. *Gut* 53, 1813–1816

- Sandborn WJ, Ferrante M, Bhandari BR, Berliba E, Feagan BG, Hibi T, Tuttle JL, Klekotka P, Friedrich S, Durante M, et al. (2020): Efficacy and Safety of Mirikizumab in a Randomized Phase 2 Study of Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 158(3), 537-549.e10
- Sands BE, Sandborn WJ, Panaccione R, O'Brien CD, Zhang H, Johanns J, Adedokun OJ, Li K, Peyrin-Biroulet L, Van Assche G, et al. (2019): Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N Engl J Med* 381, 1201–1214
- Satsangi J, Landers CJ, Welsh KI, Koss K, Targan S, Jewell DP (1998): The presence of anti-neutrophil antibodies reflects clinical and genetic heterogeneity within inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 4, 18–26
- Schäcke H, Döcke W-D, Asadullah K (2002): Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 96, 23–43
- Schäcke H, Schottelius A, Döcke W-D, Strehlke P, Jaroch S, Schmees N, Rehwinkel H, Hennekes H, Asadullah K (2004): Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 227–232
- Schaffner A (1985): Therapeutic concentrations of glucocorticoids suppress the antimicrobial activity of human macrophages without impairing their responsiveness to gamma interferon. *J Clin Invest* 76, 1755–1764
- Schett G, Neurath MF (2018): Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. *Nature Communications* 9, 3261
- Schmid W, Strähle U, Schütz G, Schmitt J, Stunnenberg H (1989): Glucocorticoid receptor binds cooperatively to adjacent recognition sites. *EMBO J* 8, 2257–2263
- Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, Trummel M, Renzulli P, Seibold F (2009): Ulcerative colitis: correlation of the Rachmilewitz endoscopic activity index with fecal calprotectin, clinical activity, C-reactive protein, and blood leukocytes. *Inflamm Bowel Dis* 15, 1851–1858
- Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SEW, Pollard JW, et al. (2012): A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336, 86–90
- Schweingruber N, Haine A, Tiede K, Karabinskaya A, Brandt J van den, Wüst S, Metselaar JM, Gold R, Tuckermann JP, Reichardt HM, Lühder F (2011): Liposomal Encapsulation of Glucocorticoids Alters Their Mode of Action in the Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* 187, 4310–4318
- Selinger CP, Andrews JM, Titman A, Norton I, Jones DB, McDonald C, Barr G, Selby W, Leong RW (2014): Long-term Follow-up Reveals Low Incidence of Colorectal Cancer, but Frequent Need for Resection, Among Australian Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 12, 644–650

- Sha S, Liang J, Chen M, Xu B, Liang C, Wei N, Wu K (2014): Systematic review: faecal microbiota transplantation therapy for digestive and nondigestive disorders in adults and children. *Aliment Pharmacol Ther* 39, 1003–1032
- Shah B, Mayer L (2010): Current status of monoclonal antibody therapy for the treatment of inflammatory bowel disease. *Expert Rev Clin Immunol* 6, 607–620
- Shah SC, Colombel J-F, Sands BE, Narula N (2016): Mucosal Healing Is Associated With Improved Long-term Outcomes of Patients With Ulcerative Colitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 14, 1245-1255.e8
- Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S-A, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A (2018): Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 233, 6425–6440
- Shi X, Chen Q, Wang F (2020): The Bidirectional Association between Inflammatory Bowel Disease and Atopic Dermatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dermatology* 236, 546–553
- Sica A, Mantovani A (2012): Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122, 787–795
- Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C (2015): Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci* 72, 4111–4126
- Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel J-F, Gasche C, Geboes K, et al. (2005): Toward an Integrated Clinical, Molecular and Serological Classification of Inflammatory Bowel Disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 19, 5A-36A
- Smith AM, Rahman FZ, Hayee B, Graham SJ, Marks DJB, Sewell GW, Palmer CD, Wilde J, Foxwell BMJ, Gloger IS, et al. (2009): Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J Exp Med* 206, 1883–1897
- Smith DF, Toft DO (1993): Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 7, 4–11
- Smith PD, Smythies LE, Mosteller-Barnum M, Sibley DA, Russell MW, Merger M, Sellers MT, Orenstein JM, Shimada T, Graham MF, Kubagawa H (2001): Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *J Immunol* 167, 2651–2656
- Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD (2005): Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 115, 66–75

- Stevceva L, Pavli P, Husband AJ, Doe WF (2001): The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of DSS used to induce it. *BMC Clin Pathol* 1, 3
- Straub RH, Cutolo M (2016): Glucocorticoids and chronic inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 55, ii6–ii14
- Strehl C, Ehlers L, Gaber T, Buttgerit F (2019): Glucocorticoids-All-Rounders Tackling the Versatile Players of the Immune System. *Front Immunol* 10, 1744
- Svendsen P, Graversen JH, Etzerodt A, Hager H, Røge R, Grønbaek H, Christensen EI, Møller HJ, Vilstrup H, Moestrup SK (2017): Antibody-Directed Glucocorticoid Targeting to CD163 in M2-type Macrophages Attenuates Fructose-Induced Liver Inflammatory Changes. *Mol Ther Methods Clin Dev* 4, 50–61
- Tanaka M, Riddell RH, Saito H, Soma Y, Hidaka H, Kudo H (1999): Morphologic criteria applicable to biopsy specimens for effective distinction of inflammatory bowel disease from other forms of colitis and of Crohn's disease from ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 34, 55–67
- Taves MD, Gomez-Sanchez CE, Soma KK (2011): Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301, E11–E24
- Teng MWL, Bowman EP, McElwee JJ, Smyth MJ, Casanova J-L, Cooper AM, Cua DJ (2015): IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med* 21, 719–729
- Thomas J, Stalker A, Breznan D, Thomson EM (2021): Ozone-dependent increases in lung glucocorticoids and macrophage response: Effect modification by innate stress axis function. *Environ Toxicol Pharmacol* 86, 103662
- Timmer A, Goebell H (1999): Incidence of ulcerative colitis, 1980-1995--a prospective study in an urban population in Germany. *Z Gastroenterol* 37, 1079–1084
- Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schütz G (1999): Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23, 99–103
- Trunova GV, Makarova OV, Diatropov ME, Bogdanova IM, Mikchailova LP, Abdulaeva SO (2011): Morphofunctional characteristic of the immune system in BALB/c and C57Bl/6 mice. *Bull Exp Biol Med* 151, 99–102
- Tuckermann JP, Kleiman A, McPherson KG, Reichardt HM (2005): Molecular Mechanisms of Glucocorticoids in the Control of Inflammation and Lymphocyte Apoptosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 42, 71–104
- Tuckermann JP, Kleiman A, Moriggl R, Spanbroek R, Neumann A, Illing A, Clausen BE,

- Stride B, Förster I, Habenicht AJR, et al. (2007): Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy. *J Clin Invest* 117, 1381–1390
- Turner JR (2009): Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 799–809
- Van Hauwermeiren F, Vandenbroucke RE, Grine L, Lodens S, Van Wonterghem E, De Rycke R, De Geest N, Hassan B, Libert C (2015): TNFR1-induced lethal inflammation is mediated by goblet and Paneth cell dysfunction. *Mucosal Immunol* 8, 828–840
- Vandevyver S, Dejager L, Tuckermann J, Libert C (2013): New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. *Endocrinology* 154, 993–1007
- Vettorazzi S, Bode C, Dejager L, Frappart L, Shelest E, Klaffen C, Tasdogan A, Reichardt HM, Libert C, Schneider M, et al. (2015): Glucocorticoids limit acute lung inflammation in concert with inflammatory stimuli by induction of SphK1. *Nat Commun* 6, 7796
- Vilasco M, Communal L, Mourra N, Courtin A, Forgez P, Gompel A (2011): Glucocorticoid receptor and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 130, 1–10
- Vindigni SM, Zisman TL, Suskind DL, Damman CJ (2016): The intestinal microbiome, barrier function, and immune system in inflammatory bowel disease: a tripartite pathophysiological circuit with implications for new therapeutic directions. *Therap Adv Gastroenterol* 9, 606–625
- Wakaskar RR (2018): General overview of lipid-polymer hybrid nanoparticles, dendrimers, micelles, liposomes, spongosomes and cubosomes. *J Drug Target* 26(4), 311–318
- Wang S, Xia P, Chen Y, Qu Y, Xiong Z, Ye B, Du Y, Tian Y, Yin Z, Xu Z, Fan Z (2017): Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation. *Cell* 171, 201–216.e18
- Watson CJ, Hoare CJ, Garrod DR, Carlson GL, Warhurst G (2005): Interferon-gamma selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores. *J Cell Sci* 118, 5221–5230
- Whitehead GS, Wilson RH, Nakano K, Burch LH, Nakano H, Cook DN (2012): IL-35 Production by ICOS+ Tregs Reverses Established IL-17-dependent Allergic Airways Disease. *J Allergy Clin Immunol* 129, 207–215.e1–5
- Whitfield GK, Jurutka PW, Haussler CA, Haussler MR (1999): Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. *J Cell Biochem Suppl* 32-33, 110–122
- Whittem CG, Williams AD, Williams CS (2010): Murine Colitis modeling using Dextran Sulfate Sodium (DSS). *J Vis Exp* 35, 1652
- Widén C, Gustafsson J-A, Wikström A-C (2003): Cytosolic glucocorticoid receptor



- interaction with nuclear factor-kappa B proteins in rat liver cells. *Biochem J* **373**, 211–220
- Wilks SS, Moxon W: *Lectures on Pathological Anatomy*. Third Edition, thoroughly revised; Longmans, Green & Co, London and New York 1889
- Wirtz S, Billmeier U, Mchedlidze T, Blumberg RS, Neurath MF (2011): Interleukin-35 mediates mucosal immune responses that protect against T-cell-dependent colitis. *Gastroenterology* **141**, 1875–1886
- Wirtz S, Popp V, Kindermann M, Gerlach K, Weigmann B, Fichtner-Feigl S, Neurath MF (2017): Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nat Protoc* **12**, 1295–1309
- Wüst S, Brandt J van den, Tischner D, Kleiman A, Tuckermann JP, Gold R, Lühder F, Reichardt HM (2008): Peripheral T Cells Are the Therapeutic Targets of Glucocorticoids in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* **180**, 8434–8443
- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW (2013): Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **496**, 445–455
- Xie Y, Xie J, Meijer AH, Schaaf MJM (2021): Glucocorticoid-Induced Exacerbation of Mycobacterial Infection Is Associated With a Reduced Phagocytic Capacity of Macrophages. *Front Immunol* **12**, 618569
- Yagi J, Arimura Y, Takatori H, Nakajima H, Iwamoto I, Uchiyama T (2006): Genetic background influences Th cell differentiation by controlling the capacity for IL-2-induced IL-4 production by naive CD4+ T cells. *Int Immunol* **18**, 1681–1690
- Yamamoto M, Yoshizaki K, Kishimoto T, Ito H (2000): IL-6 Is Required for the Development of Th1 Cell-Mediated Murine Colitis. *J Immunol* **164**, 4878–4882
- Yan Y, Kolachala V, Dalmaso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman SV, Merlin D (2009): Temporal and Spatial Analysis of Clinical and Molecular Parameters in Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis. *PLoS One* **4**, e6073
- Young EA, Abelson J, Lightman SL (2004): Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. *Front Neuroendocrinol* **25**, 69–76
- Zigmond E, Jung S (2013): Intestinal macrophages: well educated exceptions from the rule. *Trends Immunol* **34**, 162–168
- Zigmond E, Bernshtein B, Friedlander G, Walker CR, Yona S, Kim K-W, Brenner O, Krauthgamer R, Varol C, Müller W, Jung S (2014): Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity* **40**, 720–733
- Zuo T, Lu XJ, Zhang Y, Cheung CP, Lam S, Zhang F, Tang W, Ching JYL, Zhao R, Chan PKS, et al. (2019): Gut mucosal virome alterations in ulcerative colitis. *Gut* **68**, 1169–1179

## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Sybille Reichardt und meinem Doktorvater Prof. Dr. Holger Reichardt für ihre Expertise, Anleitung und Unterstützung, die für die Erstellung dieser Arbeit notwendig waren, danken. Sowie für die Möglichkeit mit ihnen meine Dissertationsarbeit zu erstellen. Insbesondere für die immer offene Tür ihrer Büros für Fragen und Rat und für ihre Geduld bin ich dankbar.

Spezieller Dank gilt hier nochmals Dr. Sybille Reichardt, die mich in das tierexperimentelle Arbeiten und die notwendigen Methoden einarbeitete und mir den ein oder anderen praktischen Trick zeigen konnte. Und vor allem mit mir die ein oder andere Stunde ausdauerte, wenn ein Versuch nicht so schnell funktionieren wollte wie erhofft oder die Probenaufarbeitung mal wieder mehr Zeit in Anspruch nahm als erwartet.

Dank gilt zudem der gesamten Arbeitsgruppe unter Prof. Reichardt: Elena Montes-Cobos, Carina Kläßen, Henrike Fischer, Tina, Kaiser, Nicky Verhoog, Laura Roßmann und Elena Arconada. Sowie insbesondere Amina Bassibas für ihre technische Unterstützung, es war immer alles optimal vorbereitet. Es war über die gesamte Zeit eine angenehme Atmosphäre mit euch, jeder stand mir Rat und Tat oder einer hilfreichen Hand beiseite. Ich habe mich mit euch sehr wohl gefühlt.

Außerdem möchte ich Jennifer Apelhans und Hannibal Bohnenberger aus dem Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen danken, die vor allem im Rahmen der immunhistochemischen Färbung mit viel Expertise unterstützten und damit zu den aussagekräftigen Bildern beitrugen.