

*Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie*

*der Universität Würzburg*

*Direktor: Professor Dr. med. Christoph-Thomas Germer*

**Untersuchungen zur Bedeutung des neurotrophen Faktors GDNF für  
die Interaktion zwischen enterischen Gliazellen und Enterozyten für  
die Regulation der Darmbarriere**

**Inauguraldissertation**

**Zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Felix Kannapin**

**aus Würzburg**

**Würzburg, Dezember 2022**



**Referent:** Prof. Dr. med. Nicolas Schlegel

**Korreferent:** Priv. Doz. Dr. Marco Metzger

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 07.09.2023

**Der Promovend ist Arzt**

**Für Ingrid & Cosima**

## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	6
1.1 Einführung zur Bedeutung der Darmbarriere .....	6
1.2 Klinischer Bezug zu chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen .....	6
1.3 Aufbau der Darmbarriere.....	9
1.3.1 Histologischer Wandaufbau des Magen-Darm-Traktes .....	9
1.3.2 Aufbau und Verteilung von Zell-Zell-Kontakten.....	11
1.3.2.1 Tight-Junctions .....	12
1.3.2.2 Adherens Junctions.....	13
1.3.2.3 Desmosome .....	14
1.3.3 Mechanismen zur Regulation der Darmbarriere .....	15
1.4 Enterisches Nervensystem.....	18
1.4.1 Aufbau, Funktion und wesentliche Komponenten .....	18
1.4.2 Enterische Neurone.....	19
1.4.3 Enterische Gliazellen.....	20
1.4.4 Charakterisierung von enterischen Gliazellen im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen .....	22
1.5 GDNF und RET-Rezeptor .....	24
1.6 Fragestellung .....	27
2. Material und Methoden .....	29
2.1 Ethik- und Tierversuchsvotum .....	29
2.2 Definitionen .....	29
2.3 Material.....	30
2.3.1 Testreagenzien.....	30
2.3.1.1 GDNF .....	30
2.3.1.2 TNF- $\alpha$ .....	30
2.3.1.3 LPS .....	31
2.3.1.4 LTA-SA .....	31
2.3.1.5 Blue 667.....	31
2.3.2 Antikörper.....	31
Tabelle 1: Antikörper indirekte Immunfluoreszenz .....	31
2.3.3 Fluoreszenzfarbstoffe .....	33

2.4 Zellkultur .....	33
2.5 Zellbiologische Methoden .....	35
2.5.1 Permeabilitätsmessung mithilfe des Transwell-Filtersystems im Ko-Kultur-Modell.....	35
2.5.2 Messung des transepithelialen Widerstandes .....	37
2.5.3 Herstellung von Zell-Lysaten .....	37
2.5.3.1 Herstellung von Zelllysaten.....	38
2.5.3.2 Herstellung von Lysaten aus Gewebeproben .....	38
2.5.4 Western Blot.....	39
2.5.5 ELISA.....	43
Tabelle 3: Verdünnungsreihe .....	43
2.5.6 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie.....	45
2.5.7 Transfektion von Zellen mit siRNA für einen Protein-Knockdown .....	47
2.5.8 Knockdown von GDNF in der CRL2690-Zelllinie mithilfe der CRISPR/Cas-9-Methode.....	48
Tabelle 4: Oligonukleotide CRISPER/Cas.....	49
2.5.9 Immunpräzipitation von GDNF aus Zellüberstand zur Depletion von GDNF .....	51
2.5.10 Zellviabilitäts-Assay .....	54
2.5.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	55
Tabelle 5: Primer qPCR.....	57
2.6 Angaben zur Statistik .....	57
3. Ergebnisse.....	59
3.1 Optimierung der Methodik und vorbereitende Untersuchungen.....	59
3.1.1 Untersuchungen zur Optimierung der TEER-Messung an Caco-2-Zellen....	59
3.1.2 Etablierung des Ko-Kultur-Modells und GDNF-Expression in vivo.....	62
3.1.2.1 Ko-Kultivierung von Caco-2-Zellen mit EGC .....	62
3.1.2.2 Caco-2- und CRL2690-Zellen exprimieren GDNF-Rezeptoren. ....	65
3.1.2.3 Unterschiedliche Expression von GDNF in der humanen Mukosa und den übrigen Darmwandanteilen in vivo .....	65
3.2 Von EGC sezerniertes GDNF führt zu einer schnelleren Reifung der intestinalen Barriere in Enterozyten.....	66

3.2.1 Eine Reduktion von GDNF aus dem Zellkulturüberstand von EGC mittels Immunpräzipitation verhindert den Anstieg des TEER. ....	67
3.2.2 Herstellung und Verwendung einer GDNF-knock-down-EGC-Zelllinie mithilfe von CRISPR/Cas.....	69
3.3 GDNF-Effekte auf Enterozyten sind RET-Rezeptor-abhängig.....	73
3.3.1 Behandlung mit Blue667 .....	73
3.3.2 Behandlung mit RET-siRNA.....	76
3.4 GDNF und enterische Inflammation .....	78
3.4.1 Die Inkubation mit Zytokinen steigert die GDNF-Expression und Sekretion in CRL-2690-Zellen. ....	78
3.4.2 GDNF stabilisiert die Barrierefunktion von Enterozyten im Inflammationsmodell über den RET-Rezeptor.....	80
3.5 Relevanz der intestinalen GDNF-Expression bei CED.....	86
3.5.1 Histopathologische Einteilung der verwendeten CED-Proben .....	86
Tabelle 6: Einteilung histopathologischer Befund .....	87
3.5.2 Die GDNF-Expression im Intestinum ist bei CED-Patienten teilweise vermindert.....	88
3.5.3 Die mukosale GDNF-Expression im Intestinum ist bei CED-Patienten teilweise erhöht.....	91
4. Diskussion .....	95
4.1 Optimierung der TEER-Messungen .....	95
4.2 Eine Ko-Kultur mit Caco-2-Zellen und CRL-2690-Zellen stellt ein geeignetes In-vitro-Modell zur Untersuchung der Barrierefunktion von Enterozyten dar.....	96
4.3 Von enterischen Gliazellen sezerniertes GDNF beschleunigt die Reifung der Barrierefunktion von Enterozyten und stabilisiert diese während einer Inflammation. ....	98
4.4 Die GDNF-Effekte auf Enterozyten werden über den RET-Rezeptor vermittelt. ....	101
4.5 EGC sind eine der wichtigsten GDNF-Quellen im Intestinum und könnten eine erhebliche Rolle in der Pathogenese von CED einnehmen. ....	102
4.6 CED-Patienten zeigen Veränderungen der GDNF-Expression im Darm. ....	104
5. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	107
6. Literaturverzeichnis:.....	108
Appendix .....	122

I Abkürzungsverzeichnis .....	122
II Abbildungsverzeichnis.....	125
III Tabellenverzeichnis .....	127
IV Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen.....	128
V Patientencharakteristika der verwendeten Darmgewebeproben .....	130
Tabelle 7: Kontrollpatienten.....	130
Tabelle 8: CED-Patienten.....	131

## **1 Einleitung**

### **1.1 Einführung zur Bedeutung der Darmbarriere**

Das Darmepithel des Menschen stellt eine enorme Fläche für den Austausch von Stoffen zur Verfügung. Auch wenn seine Resorptionsfläche lange Zeit überschätzt wurde, beträgt diese nach neueren Berechnungen etwa 32 Quadratmeter und stellt somit die größte Grenzfläche zwischen Umwelt und Körperinnerem dar (Helander and Fandriks 2014). Das Darmepithel wird aus einer einzelnen Schicht aus Zellen gebildet, die überwiegend Enterozyten sind und das gesamte Darmlumen auskleiden. Diese Zellschicht bestreitet zwei kritische Funktionen: Einerseits müssen über das Darmepithel essenzielle Nährstoffe, Elektrolyte und Wasser den Übertritt in den Blutkreislauf erreichen, was durch einen komplex regulierten Transport ermöglicht wird. Zum anderen muss das Darmepithel eine Barrierefunktion gegenüber potenziell schädlichen Stoffen, Mikroorganismen und deren Toxinen bilden, die verhindert, dass diese in den Organismus eindringen. Die Schutzfunktion wird durch auf dem Darmepithel befindliche Proteine wie Muzine und antimikrobiell wirksame Defensine als zusätzliche Schutzschicht auf dem Epithel verstärkt (Hoffmann et al. 2004). Bei Entzündungsreaktionen ist die Darmbarriere kompromittiert, wobei insbesondere der parazelluläre Weg zwischen den Epithelzellen gestört ist (Groschwitz and Hogan 2009). Bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen spielt die Störung der Darmbarriere eine zentrale Rolle für die Manifestation und Aufrechterhaltung der Krankheitssymptome.

### **1.2 Klinischer Bezug zu chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen**

Als chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) werden hauptsächlich die beiden Entitäten Morbus Crohn (MC) und Colitis Ulcerosa (CU) zusammengefasst. Die Prävalenz der CED in Deutschland wird auf bis zu 150 pro 100.000 Einwohner geschätzt (Stallmach et al. 2012). Beide Entitäten treten meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr erstmalig auf, können sich jedoch auch schon im Kindesalter manifestieren. Das frühe Erkrankungsalter, der chronische Verlauf und die zum Teil hohen Behandlungskosten unterstreichen den gesundheitsökonomischen Stellenwert beider Erkrankungen (Preiss et al. 2014). Auch wenn sich die beiden Krankheitsbilder hinsichtlich Symptomatik und

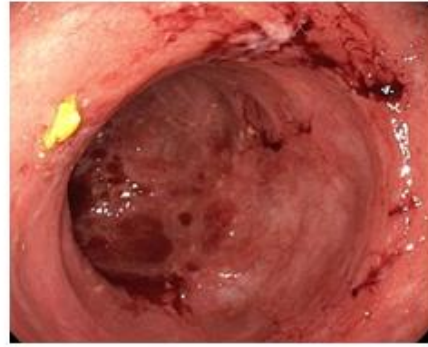


Therapie ähneln, existieren doch einige morphologische Unterschiede. MC weist histologisch eine transmurale, granulomatöse Entzündungsreaktion auf und kann diskontinuierlich im gesamten Gastrointestinaltrakt auftreten. Eine typische Lokalisation stellt hierbei das terminale Ileum dar. Die CU hingegen beginnt meist im Rektum und breitet sich kontinuierlich nach proximal in das Kolon aus. Auch bleibt die Entzündungsreaktion histologisch bei CU auf die Mukosa beschränkt und zeigt Kryptenabszesse. Die Symptomatik der CED ist vielseitig und kann neben gastrointestinalen Symptomen wie blutigen Durchfällen, Stenosierung und Gewichtsverlust auch extraintestinale Manifestationen wie Uveitiden und Arthritiden aufweisen. Die chronische Entzündung bringt bei typischer Lokalisation vor allem bei CU-Patienten ein erhöhtes Risiko für kolorektale Karzinome mit sich, bei MC-Patienten kennzeichnen rezidivierende Darmstenosen, Fistel- und Abszessbildung den Verlauf, was zu einer hohen Lebenszeitprävalenz für viszeralchirurgischen Operationen führt (Wehkamp et al. 2016).

Die Pathogenese beider Erkrankungen ist noch nicht abschließend verstanden, jedoch ist eine multifaktorielle Genese anzunehmen. Die genetische Prädisposition stellt einen der beitragenden Faktoren dar. So konnten in genomweiten Assoziationsstudien multiple risikobehaftete Genloci für die Entwicklung einer CED isoliert werden (McGovern et al. 2015), und einzelne genetische Aberrationen wie die NOD-2-Genmutation bei MC wurden bei einem Teil der betroffenen Patienten als Auslöser der Erkrankung identifiziert (Strober et al. 2008; Kupka et al. 2018). Ein weiteres Puzzleteil in der Pathogenese der CED ist eine Störung der Immunantwort auf lokaler und systemischer Ebene (Kaser et al. 2010; Uhlig 2013; Geremia et al. 2014). Zusätzlich existieren, wie bei vielen anderen Erkrankungen, auch bei CED begünstigende Umweltfaktoren. Beispielhaft wäre die Einnahme von Antibiotika oder nichtsteroidalen Antirheumatika zu nennen (Dubeau et al. 2013; Ananthakrishnan et al. 2018). Als letzter Faktor ist die Zusammensetzung des Mikrobioms zu erwähnen. Auch wenn eine direkte Kausalität mit dem Auftreten von CED noch nicht bewiesen werden konnte, verdichten sich die Hinweise, dass die Zusammensetzung bzw. Dysbalance des Darmmikrobioms zur Entstehung bzw. zum Unterhalt von Entzündungsreaktionen im Darm beiträgt (Barko et al. 2018).

Die genannten Faktoren wirken sich allesamt wechselseitig auf die intestinale Barrierefunktion aus, wobei der Verlust der Integrität der Barrierefunktion des Darms als übergeordnetes Schlüsselereignis in der Pathogenese und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion bei CED betrachtet wird (Abraham and Cho 2009; Martini et al. 2017). Der Verlust der physiologischen Barrierefunktion geht mit strukturellen Veränderungen im Aufbau und einer alterierten Expression von Tight-Junction-Proteinen einher (Edelblum and Turner 2009). Zusätzlich zeigen sich proinflammatorische Zytokinmuster. In der Folge der Inflammation kommt es zu einer herabgesetzten Integrität der Darmbarriere, wodurch eine Invasion von luminalen Antigenen in die Submukosa erleichtert wird. Diese Antigene begünstigen eine Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) und verschiedenen Interleukinen, was den Zusammenbruch der Barrierefunktion weiter voranschreiten lässt (Hollander 2002; Salim and Soderholm 2011). Die Pathogenese dieses sich selbst unterhaltenden Teufelskreises ist trotz intensiver Forschung noch nicht abschließend geklärt, da es sich um ein komplexes multifaktorielles Geschehen handelt. In diesem Kontext ist interessant, dass der makroskopisch sichtbaren Entzündungsreaktion der Darmschleimhaut Permeabilitätsveränderungen in makroskopisch nicht entzündeten Bereichen vorausgehen (Peeters et al. 1994). CED-Patienten können auch während Remissionsintervallen an Symptomen wie abdominellen Schmerzen und Diarrhoe leiden, was laut Chang und Kollegen auf eine weiterhin beeinträchtigte intestinale Barrierefunktion zurückzuführen ist (Chang et al. 2017).

Es gibt Hinweise, dass im Besonderen enterische Gliazellen [engl. enteric glial cells (EGC)] und die von ihnen sezernierten neurotrophen Faktoren in die Pathogenese der CED involviert sind. Pochard und Kollegen postulieren in einer Übersichtsarbeit zu diesem Thema, dass Morbus Crohn womöglich eine enterische Gliopathie darstelle (Pochard et al. 2018) und damit das enterische Nervensystem sogar einen entscheidenden Einfluss auf die Krankheitsdynamik haben könnte.



**Abbildung 1: OP-Situs und Endoskopie-Bild bei Morbus Crohn**

Entzündetes terminales Ileum im OP-Situs (links). Ödematös geschwollene Schleimhaut mit Einblutungen bei florider Entzündung (rechts).

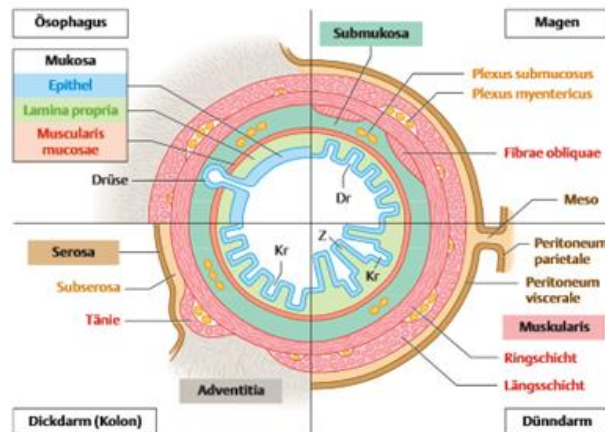
*Quelle: Dr. med. Michael Meir (Universitätsklinikum Würzburg), Genehmigung zur Verwendung im Rahmen der Dissertation liegt vor.*

Aufbauend auf diesen Beobachtungen und der Bedeutung der intestinalen Barrierefunktion bei CED soll in dieser Arbeit die Rolle eines neurotrophen Faktors, der von Gliazellen sezerniert wird, untersucht werden. Aus diesem Grund wird nachfolgend der Aufbau der Darmbarriere dargestellt, bevor das enterische Nervensystem und neurotrophe Faktoren skizziert werden.

### **1.3 Aufbau der Darmbarriere**

#### **1.3.1 Histologischer Wandaufbau des Magen-Darm-Traktes**

Die folgende Abbildung zeigt einen schematischen Querschnitt des Magen-Darm-Traktes (MDT). Dieser stellt einen Teil des Rumpfdarmes dar und seine Wandschichten folgen im Aufbau, bis auf einige regionale Unterschiede, demselben histologischen Muster.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Wandschichten des MDT**

Die Querschnitte verdeutlichen den allgemeinen Wandaufbau des Verdauungskanals. Bei den intraperitoneal gelegenen Organen wird die Adventitia durch die Subserosa und Serosa ersetzt.

*Quelle: Taschenlehrbuch Histologie, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Genehmigung zur Verwendung im Rahmen der Dissertation liegt vor.*

Schematisch lässt sich die Darmbarriere in eine extrazelluläre, kommensale und zelluläre Komponente gliedern (Schlegel et al. 2021). Am weitesten apikal gelegen ist die Mukusschicht. Diese bedeckt die Darmschleimhaut und repräsentiert damit die extrazelluläre Komponente der Darmbarriere. Sie besteht aus glykolisierten Proteinen, sog. Muzinen, die von Becherzellen sezerniert werden und eine hohe Wasserbindungskapazität besitzen. Zum einen erschwert diese Schutzschicht den rein mechanischen Kontakt von hydrophilen Pathogenen mit Enterozyten. Zum anderen enthält der visköse Schleim eine Vielzahl von antimikrobiell aktiven Peptiden, Immunglobulin A und Defensinen, die durch Paneth-Zellen gebildet werden. Zur Abwehr potentieller Pathogene mit hydrophoben Eigenschaften existieren an der apikalen Zellmembran der Enterozyten ABC-Transporter (MDR-1-Protein), die Stoffe aktiv aus der Zelle hinausbefördern können (Lüllmann-Rauch and Asan 2019).

Der kommensale Anteil der Darmbarriere wird durch eine Vielzahl von Bakterien geformt, die eng mit Darmepithelzellen interagieren (Deplancke and Gaskins 2001). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Darmbakterien über Toll-like-Rezeptoren (TLR)

die Barriere-Eigenschaften des Darms verändern können, was die Entwicklung einer CED oder anderer durch Inflammation charakterisierter Erkrankungen begünstigt (Frosali et al. 2015).

Mit Ausnahme des Ösophagus und des Analkanals ist der MDT durch ein einschichtiges Zylinderepithel ausgekleidet, das die Lamina epithelialis bildet und die zelluläre Komponente der Darmbarriere darstellt. Regionale Besonderheiten lassen sich den jeweiligen Funktionen des Darmabschnittes zuordnen. So ist die Epithelzellschicht im Dünndarm in Zotten und Krypten (Villi intestinales) angeordnet, um eine Oberflächenvergrößerung zu erzielen. Andernfalls wären die zahlreichen Resorptionsvorgänge in diesem Darmabschnitt nicht effektiv zu bewältigen. Im Dickdarm hingegen finden sich ausschließlich Krypten, die tubulöse Einsenkungen des Zylinderepithels darstellen. Die Krypten beherbergen die Stammzellen für die Zellregeneration des Epithels, das sich alle drei bis fünf Tage erneuert (Williams et al. 2015). Ergänzend können enterische Gliazellen und Neurone auch der zellulären Komponente der Darmbarriere zugeordnet werden. Diese werden jedoch im zugehörigen Kapitel ‚Enterisches Nervensystem‘ ausführlich charakterisiert.

Eine entscheidende Rolle für den interzellularen Zusammenhalt der Enterozytenschicht und damit für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere spielen Junktionsproteine, die die parazellulären Zwischenräume zwischen einzelnen Enterozyten versiegeln. Da die Plasmamembran der Darmepithelzellen für hydrophile Moleküle undurchlässig ist, wird so eine selektive Passage durch Endo- und Transzytose-Vorgänge ermöglicht. Jedoch erlauben bestimmte Expressionsmuster der Junktionsproteine einen passiven Transport von Stoffen aus dem Darmlumen hinaus, womit keine uneingeschränkte Barriere besteht (Krug et al. 2014).

### **1.3.2 Aufbau und Verteilung von Zell-Zell-Kontakten**

Zell-Zell-Kontakte folgen einem gemeinsamen Bauprinzip. Sie sind Transmembranproteine, die benachbarte Zellen über den Intrazellulärspace miteinander verbinden. Eine Verankerung im Zytoskelett von Zellen erfolgt über Adapterproteine. Zellkontakte zeigen

zudem unterschiedliche gewebetypische Expressionsmuster. Der junktionale Komplex, oder Schlussleistenkomplex, ist typisch für alle einschichtigen Epithelien und folgt von apikal nach basal folgendem Aufbau:

1. Zonula occludens oder Tight-Junctions
2. Adhärenskontakte oder Zonula adhaerens
3. Desmosomen oder Macula adhaerens

### **1.3.2.1 Tight-Junctions**

Transmembranproteine der Tight-Junction-Familie repräsentieren die in der Zelle am weitesten apikal gelegenen Zell-Zell-Kontakte des Schlussleistenkomplexes (Farquhar and Palade 1963). Schneeberger und Lynch teilen den multimolekularen Tight-Junction-Komplex in drei Gruppen ein. Die erste Gruppe bilden integrale Tight-Junction-Proteine. Hierzu zählen Claudine (Cl), Occludin und Junctions-Adhäsions-Moleküle [engl. Junction Adhesion Molecules (JAMs)]. Diese versiegeln den interzellulären Spalt und erhalten so die Zellpolarität aufrecht. Die zweite Gruppe besteht aus Adapterproteinen wie Zonula Occludens (ZO) 1, 2 und 3, die die Verankerung des Komplexes im Zytoskelett der Zellen über den Kontakt zu filamentärem Aktin (F-Aktin) herstellen.

Wie suffizient der Tight-Junction-Komplex den Interzellulärspalt verschließt, hängt von der Zusammensetzung des Komplexes entsprechend der jeweiligen Funktion des Gewebes ab und wird dynamisch an den jeweiligen Bedarf angepasst. Bewerkstelligt wird diese Anpassung durch unterschiedliche Expressionsmuster der Transmembranproteine. Der menschliche Körper exprimiert mindestens 26 verschiedene Claudine. Während Claudin 1, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 18 und 19 abdichtende Eigenschaften aufweisen, reduzieren Claudin 2, 10, 15 und 17 den transepithelialen Widerstand. Diese Reduktion wird unter anderem durch den Einbau von Aquaporinen bewerkstelligt, was die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts im Körper beeinflusst (Rosenthal et al. 2020). Verdeutlicht wird dies auch durch das unterschiedliche Vorkommen der Claudin-Typen im humanen Intestinum. Einige Subtypen, wie Claudin 1, 2, 7, 12 und 15, werden entlang des gesamten Intestins exprimiert. Claudin 5 konnte bisher nur im Colon, nicht aber im Ileum nachgewiesen werden und die Expression der Claudin-Subtypen 3, 4, 7 und 8 ist im distalen Colon

ungleich höher als im restlichen Intestinum (Lameris et al. 2013; Garcia-Hernandez et al. 2017). Dies beschränkt sich nicht nur auf die unterschiedlichen Darmabschnitte, sondern betrifft auch den Entwicklungszustand von Enterozyten. Voll differenzierte Enterozyten an der Villusspitze enthalten einen höheren Anteil an hochabdichtendem Claudin 1. Undifferenzierte oder unreife Enterozyten in den Krypten exprimieren dagegen vermehrt das ‚leaky‘ Claudin-2-Protein, das zusätzlich zu seiner porenbildenden Funktion auch proliferative Eigenschaften aufweist (Turner 2009; Lu et al. 2013; Garcia-Hernandez et al. 2017). In Biopsien von MC-Patienten ist eine durch Interleukine vermittelte Hochregulation von Claudin 2 regelhaft zu beobachten. Demgegenüber ist die Expression von Claudin 5 und 8 sowie von Occludin in den entsprechenden Darmabschnitten vermindert, was auf eine Störung der Barrierefunktion hindeutet (Zeissig et al. 2007).

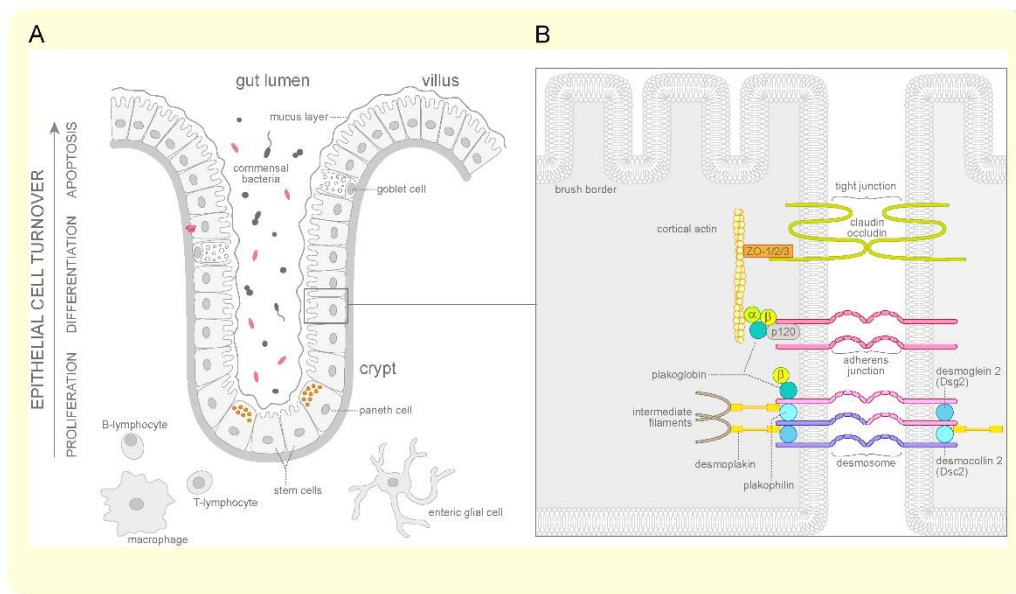
### **1.3.2.2 Adherens Junctions**

Adhärenz-Kontakte (engl. adherens junctions) spielen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung von Zellverbänden. Sie sind für das Aneinanderhaften von Zellen verantwortlich und sichern somit Tight-Junction-Verbindungen mechanisch ab. Sie gehören den Protein-Familien der Cadherine ( $\text{Ca}^{2+}$ -dependend adhesion molecules) bzw. Nectinen an, wobei epitheliales Cadherin (E-Cadherin) eine dominante Rolle im Zusammenhalt von Epithelzellverbänden einnimmt (van Roy and Berx 2008; Campbell et al. 2017). Die Basis für die mechanische Stabilität von Epithelzellen stellt die Dimerisierung von zwei extrazellulär gelegenen E-Cadherin-Domänen sich gegenüberliegender Zellen dar. Diese Verbindung ist Kalzium-abhängig. Die zytoplasmatische Domäne der E-Cadherin-Proteine ist hierbei über Plaque-Proteine mit dem Aktin- und Myosin-Netzwerk der Zelle verbunden. Die Verbindung zu  $\beta$ -Catenin stellt die am besten verstandene intrazelluläre Brücke der beiden Proteine dar. An der Plasmamembran wird der Proteinkomplex durch  $\alpha$ -Catenin ergänzt und um weitere Aktin-assoziierte Proteine erweitert (Quiros and Nusrat 2014). Dieser Multiproteinkomplex überträgt extrazelluläre mechanische Reize an den Zellkern.  $\beta$ -Catenin fungiert hierbei als Transkriptionsfaktor. Die dyadische Rolle von  $\beta$ -Catenin wird dadurch deutlich, dass ein E-Cadherin-unabhängiges  $\beta$ -Catenin Reservoir über den Wnt-Signalweg eine wesentliche Funktion bei der Embryogenese und Zellproliferation einnimmt (Pronobis and Peifer 2012).

### 1.3.2.3 Desmosome

Desmosome bilden die Klasse der am weitesten basal liegenden Zell-Zell-Kontakte im Schlussleistenkomplex. Sie sind schiffsnietenartig an den Zellgrenzen angeordnet und sorgen durch eine mechanische Stabilisierung für den Zusammenhalt des Zellverbandes. Als Desmosome wird die Superfamilie der kalziumabhängigen Cadherine Desmoglein (Dsg 1-4) und Desmocollin (Dsc 1-3) klassifiziert (Getsios et al. 2004; Kottke et al. 2006). Im Darmepithel werden Dsg2 und Dsc2 exprimiert. Bis vor wenigen Jahren war die funktionelle Rolle der Desmosomen im Darm weitgehend unerforscht, inzwischen ist jedoch gut belegt, dass insbesondere Dsg2 eine zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung der intestinalen Barrierefunktion spielt (Schlegel et al. 2010). Mukosa-Biopsien von MC-Patienten zeigen eine verminderte Expression von Dsg 2, was darauf hinweist, dass die Störung der Darmbarriere bei diesen Patienten unter anderem durch den Verlust von Dsg2 mitverursacht wird (Spindler et al. 2015). Dazu passend wurde in Tierversuchen nachgewiesen, dass Mäuse mit einer Defizienz für Dsg2 im Darmepithel eine erhöhte Vulnerabilität für eine Dextran-Sulfat-Natrium(DSS)-induzierte Colitis aufweisen (Gross et al. 2018). Dsc2 reguliert die Integrin-abhängige Zelladhäsion und -migration und scheint dabei für die intestinale Wundheilung der Mukosa von Bedeutung zu sein (Flemming et al. 2020). Die Bedeutung der Desmosome beschränkt sich hierbei nicht nur auf die Funktion als Zell-Zell-Kontakte. Sie treten auch als Ankerproteine an Intermediärfilamenten in Erscheinung. Eine mechanische Stabilisierung wird hierbei über eine Verankerung zu Proteinen der Armadillo-Familie, wie Plakoglobin und Plakophilin, erreicht. Diese wiederum fixieren über eine Verankerung an Desmoplakin den desmosomalen Komplex am Geflecht der Intermediärfilamente (Kowalczyk and Green 2013). Neben den bereits genannten Aufgaben dienen Desmosome als Signalknotenpunkte für die intra- und interzelluläre Kommunikation (Hartlieb et al. 2014; Spindler and Waschke 2018; Yulis et al. 2018).





**Abbildung 3: Abschlussleistenkomplex**

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau des Abschlussleistenkomplexes zwischen zwei Enterozyten.

Quelle: Schlegel et al. 2021, Genehmigung zur Verwendung im Rahmen der Dissertation liegt vor.

### 1.3.3 Mechanismen zur Regulation der Darmbarriere

Physiologische und immunologische Reize üben einen Einfluss auf zelluläre und extrazelluläre Komponenten der intestinalen Barriere aus. Einer der am besten untersuchten Mechanismen stellt in diesem Zusammenhang die Wirkung der Zytokine TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  auf Tight-Junction-Proteine dar. Durch eine Zytokin-induzierte Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase [engl. Myosin light chain kinase (MLCK)] erfolgt eine Kontraktion des Zytoskeletts der Darmepithelzellen. Diese Kontraktion wird über Transmembranproteine an die Tight-Junction-Proteine fortgeleitet. Die erhöhte mechanische Spannung an den Junctions-Proteinen bewirkt ein Auseinanderdriften der apikalen Zell-Zell-Kontakte. Dies resultiert in einer Steigerung der parazellulären Permeabilität. Nicht nur die genannten Zytokine führen zu einer Aktivierung der MLCK, sondern eine Vielzahl inflammatorischer und immunologischer Stimuli beeinflussen über die MLCK Tight-Junction-Proteine (Zolotarevsky et al. 2002; Clayburgh et al. 2005; Turner 2009). Weitere Triggerfaktoren des beschriebenen Mechanismus stellen das Zytokin Interleukin-

1-beta (IL-1 $\beta$ ) (Al-Sadi et al. 2008), bakterielle Toxine von enteropathogenen *Escherichia coli*-Stämmen (Zolotarevsky et al. 2002) und Lipopolysaccharide (LPS) (Moriez et al. 2005) dar. Ein weiterer bedeutsamer Mechanismus bezüglich der Barriere-regulation im Darm betrifft p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK). Diese werden als Reaktion auf unterschiedliche extrazelluläre Stressreize von Zellen aktiviert und tragen, über Zytokine vermittelt, zu inflammatorischen Prozessen bei (Zarubin and Han 2005). Die enge Regulation der p38-MAPK-Aktivität scheint für den Erhalt des Homöostase-Zustandes des Darmepithels von entscheidender Bedeutung zu sein. Dies wird dadurch verdeutlicht, dass eine fast vollständige Deletion der p38 $\alpha$ -Protein-Kinase in dendritischen Zellen Mäuse vor der Entwicklung einer DSS-induzierten Colitis schützt (Zheng et al. 2018) und eine Inhibierung der p38-MAPK bei In-vitro-Experimenten den durch TNF- $\alpha$  ausgelösten Zusammenbruch der intestinalen Barriere verhindert (Spindler et al. 2015). Ferner ist eine Dsg2-vermittelte Aktivierung der p38-MAPK für die Wiederherstellung der Barrierefunktion von Enterozyten von Bedeutung (Ungewiss et al. 2017).

In-vitro-Studien an Zellmodellen mit Darmepithelzellen haben ergeben, dass eine Behandlung mit TNF- $\alpha$  eine Desorganisation und verminderte Expression abdichtender Tight-Junctions-Proteine zur Folge hat (Schmitz et al. 1999). Vice versa verursacht die gleiche Behandlung aber eine vermehrte Expression des porenbildenden Claudin 2, was über eine vermehrte Aktivierung der PI3-Kinase vermittelt wird (Mankertz et al. 2009). In beiden Fällen erhöht sich die parazelluläre Permeabilität. Im Einklang mit diesen Ergebnissen stehen Untersuchungen an Darmproben von CED-Patienten. Diese zeigen in Gefrierschnitten eine verminderte Anzahl der abdichtenden Tight-Junction-Proteine Occludin, Claudin 5 und Claudin 8 sowie einen erhöhten Anteil an Strangdiskontinuitäten. Zudem sind bei beiden Krankheitsentitäten die Apoptoserate und die Expression von Claudin 2 erhöht. Als ein Schlüsselzytokin für die Induktion von Barrierestörungen bei CED wurde TNF- $\alpha$  identifiziert (Schulzke et al. 2009).

Das einschichtige Zylinderepithel des MDT stellt keinen statischen Zellverband dar, sondern entspricht vielmehr einem sich ständig erneuernden Kontinuum. Dabei können zwei Arten der Zellerneuerung unterschieden werden. Zum einen die stetige Zellerneuerung unter Homöostase-Bedingungen. Die Basis für diesen Kreislauf bilden Stammzellen am

Kryptengrund, die zwischen Paneth-Zellen und Myofibroblasten eingebettet sind. Verschiedene lokale Wachstumsfaktoren erzeugen einen Proliferationsreiz. Dabei migrieren hoch aktive Progenitorzellen in Richtung der Villusspitze und differenzieren sich währenddessen zu Enterozyten, enteroendokrinen oder sekretorischen Zelltypen. Nach Erreichen der Zottenspitze und der vollständigen Ausdifferenzierung sterben die Zellen durch Apoptose ab und der Zyklus beginnt neu (Bankaitis et al. 2018; Lüllmann-Rauch and Asan 2019).

Zum anderen wird die Zellerneuerung durch Mechanismen der Wundheilung definiert. Als Reaktion auf eine Beschädigung des Schleimhautepithels wandern Epithelzellen aus den angrenzenden Krypten in den Defekt ein und bedecken ihn. Dieser als Rekonstitution bezeichnete Prozess beginnt bereits wenige Minuten nach Entstehung einer Wunde. Dabei finden auch Veränderungen am Zytoskelett der Epithelzellen statt, was ein Abflachen und eine Art Vorwärtsbewegung zur Abdeckung der Wunden ermöglicht (Quirós and Nusrat 2019). Dieser Vorgang ist im Kontext der vorliegenden Arbeit vor allem im Zusammenhang mit CED interessant, da die intestinale Wundheilung bei diesen Krankheitsbildern beeinträchtigt ist. Das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  nimmt hierbei eine doppelte Funktion wahr. TNF- $\alpha$  trägt zur Pathogenese von CED bei, was durch den erfolgreichen Einsatz von TNF- $\alpha$ -Antikörpertherapien in der Behandlung und Remissionserhaltung der CED demonstriert wird (Shah and Mayer 2010; Bank et al. 2015). Jedoch besitzt TNF- $\alpha$  auch pleiotrope Effekte, die sich förderlich auf die Wundheilung auswirken. Beispielweise untersuchten Bradford und Kollegen die Tatsache, dass der TNF- $\alpha$ -Antikörper Etanercept, der lösliches TNF- $\alpha$  bindet, keinen Erfolg bei der Behandlung von Patienten mit CED zeigt. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass TNF- $\alpha$  auch positiv auf die Heilung von intestinalen Ulcera wirken kann (Bradford et al. 2017). Dieser vordergründige Widerspruch könnte eine Erklärung für ein Nichtansprechen der Antikörpertherapie bei einem Teil der Patienten sein.

Neben Zytokinen existiert aber noch eine Vielzahl anderer Faktoren, die die intestinale Barrierefunktion und die Wundheilung beeinflussen. Diese Faktoren entstammen dem enterischen Nervensystem.

## 1.4 Enterisches Nervensystem

### 1.4.1 Aufbau, Funktion und wesentliche Komponenten

Das enterische Nervensystem (ENS) stellt ein intramurales Nervengeflecht dar, das den MDT vom Ösophagus bis zum Rektum durchzieht (Furness 2000). Gebildet wird es aus zahlreichen Neuronen und Gliazellen. Durch Entwicklungsstudien an Modellorganismen und genetische Studien an der bekanntesten Erkrankung des ENS, Morbus Hirschsprung, konnte ein detailliertes Verständnis für dessen Entwicklungsgeschichte geschaffen werden. Die pluripotenten Vorläuferzellen des ENS stammen aus der Neuralleiste und migrieren bis zur 12. Schwangerschaftswoche in den Darm. Nach der initialen Besiedlung entwickelt und differenziert sich das ENS weiter in verschiedene Subtypen von Gliazellen und Neuronen. Wachstumsfaktoren, die diesen Vorgang steuern, sind unter anderem GDNF- (engl. glial cell line-derived neurotrophic factor) und der zugehörige RET- (engl. rearranged during transfection) Rezeptor, Endothelin-3 sowie verschiedene Transkriptionsfaktoren wie SOX10 oder PHOX2B (Hollander 2003; Lake and Heuckeroth 2013). Das ENS besteht aus einer Gesamtzahl von ungefähr  $5 \times 10^8$  Neuronen. Mit einem Verhältnis von im Durchschnitt 7:1 sind enterische Gliazellen (enteric glial cells=EGC) den Neuronen im ENS zahlenmäßig weit überlegen. Beide Gruppen organisieren sich in zwei ganglienhaltige Stränge um die glatte Muskulatur des MDT: den Plexus myentericus (Auerbach) zwischen äußerer und innerer Schicht der Tunica muscularis und den Plexus submucosus in der Tela submucosa, der nur im Dick- und Dünndarm ausgebildet ist (Young 2012; Vergnolle and Cirillo 2018). Im Gegensatz zu anderen Säugern setzt sich der humane Plexus Submucosus aus drei verschiedenen Plexus zusammen: dem Meissner-Plexus direkt unter der Mukosa, dem Intermediär-Plexus auf Höhe der mukosalen Blutgefäße und dem Henle-Plexus, der in Kontakt zur zirkulären Muskelschicht der Darmwand steht (Neunlist et al. 2003). Das ENS orchestriert die Innervation des gesamten MDT, wobei sich seine Rolle je nach Lokalisation ändert. Während die Kontraktion der Ösophagusmuskulatur und die Steuerung der Magenfunktionen über vasovagale Reflexe zu einem Großteil dem ZNS obliegen, weist das ENS im Dün- und Dickdarm vollausgebildete Reflexkreisläufe auf, um Motilität, epitheliale exo- und endokrine Sekretionsmechanismen, den Blutfluss sowie die Immunantwort im Darm zu steuern. Dies ist möglich, da fast jede Zelle in der Darmwand mit Nervenzellen des ENS kommuniziert. Die Steuerung dieser Funktionen erfolgt weitestgehend autonom vom Zentralnervensystem, weshalb das

ENS auch oft als ‚zweites Gehirn‘ bezeichnet wird. Darüber hinaus erfolgt aber auch im Intestinum eine Interaktion mit zentralen sympathischen und parasymphatischen Reizen sowie Hormonen, um auf Bedürfnisse des Gesamtorganismus zu reagieren (Benninghoff et al. 2008; Furness et al. 2014; Schneider et al. 2019).

Um die komplizierte Biologie dieses Systems in Kürze verständlich zu beschreiben, ist es notwendig, das ENS auf seine beiden Hauptkomponenten zu reduzieren: Neurone und Gliazellen.

#### **1.4.2 Enterische Neurone**

Es existiert eine große Anzahl verschiedener Subtypen von Neuronen im Gastrointestinaltrakt. So lassen sich zum Beispiel neben exzitatorischen und inhibitorischen Motoneuronen vaso- und sekretomotorische Neurone sowie Interneurone und sensorische Neurone unterscheiden (Furness 2000). Über 30 Neurotransmitter wurden im Zusammenhang mit dem ENS bereits identifiziert. Oftmals enthalten Vesikel in den Synapsen gemäß ihrer Funktion mehrere verschiedene Transmitter, was als ‚chemical coding‘ bezeichnet wird. Exzitatorische Motoneurone sezernieren meist Acetylcholin oder Substanz P. Inhibitorische Motoneurone sezernieren dagegen vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP), Stickstoffmonoxid (NO) oder Enkephaline. Sekretion und Blutfluss der Mukosa werden durch sekreto- und vasomotorische Neurone reguliert. Diese reagieren auf luminale Reize, wobei sie durch freigesetzte lokale Mediatoren wie Serotonin (5-HT) aktiviert werden (Hansen 2003). Auch ein direkter Einfluss von enterischen Neuronen auf die Permeabilität der Darmbarriere ist beschrieben. So reduzieren submukosale Neurone die intestinale Permeabilität durch die Modulation der Expression von Tight-Junction-Proteinen über VIPerge neuronale Leitungsbahnen (Neunlist et al. 2003). Der Neurotransmitter Neuropeptid Y (NPY) hingegen kann über eine PI3-Kinase-vermittelte Hochregulation von Claudin-2-Proteinen die Permeabilität der intestinalen Barriere während Entzündungsreaktionen erhöhen (Chandrasekharan et al. 2013).

### 1.4.3 Enterische Gliazellen

EGC ähneln mit ihrem sternförmigen Aussehen und ihren verzweigten Ausläufern den ihnen in Morphologie und Funktion verwandten Astrozyten im ZNS. Lange Zeit wurden sie lediglich als passive Stützzellen enterischer Neuronen wahrgenommen. Dieses Konzept änderte sich jedoch über die vergangenen zwei Jahrzehnte, in denen gezeigt wurde, dass diese sowohl bei physiologischen als auch pathologischen Prozessen im Darm eine zentrale Rolle einnehmen.

Intestinale Gliazellen bilden eine sehr heterogene Zellgruppe im ENS, für die noch kein einheitliches Klassifikationssystem existiert. Sie besitzen, ähnlich wie Astrozyten, ein dichtes Netz aus Intermediärfilamenten, das reich an saurem Gliafaserprotein [engl. Glial fibrillary acidic protein (GFAP)] ist. Weitere bekannte und gut evaluierte Glia-Zellmarker sind das Calcium-bindende Protein S100 $\beta$  und SOX 10 (Gulbransen 2014; Pochard et al. 2018). Da nicht alle intestinalen Gliazellen GFAP exprimieren, können diese als Marker verwendet werden, um GFAP-positive und -negative Subpopulationen zu identifizieren. Bei dieser Einteilung muss gleichwohl bedacht werden, dass durch Stimulation mit Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  oder Lipopolysaccharid (LPS) die Expression von GFAP signifikant ansteigt. Dieser Effekt lässt sich nur zum Teil durch Proliferation der GFAP-positiven Zellen erklären. Vielmehr werden durch die Entzündungsmediatoren GFAP-negative Gliazellen aktiviert und exprimieren fortan GFAP als Folge der Behandlung (von Boyen et al. 2004). Auch lässt sich durch die Behandlung mit Entzündungsmediatoren die Expression und Sekretion von neurotrophen Faktoren wie GDNF in den intestinalen Gliazellen steigern (von Boyen et al. 2006). Die gesteigerte Expression von GFAP wird im Rahmen von Entzündungsreaktionen auch als Gliose bezeichnet. Im ZNS wird dieses Phänomen Astrogliose genannt und dient vornehmlich dazu, Entzündungsreaktionen zu kontrollieren, wobei aber auch eine Rolle in der Pathophysiologie von neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert wird (Pekny et al. 2014; Osborn et al. 2016). Wie bereits angedeutet, übernehmen EGC im ENS mannigfaltige Funktionen, sodass sich ein intaktes Netzwerk aus Gliazellen als existenziell für das Überleben enterischer Neuronen herausgestellt hat. Die von ihnen sezernierten neurotrophen Faktoren wie Neurturin, GDNF, BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) und NGF (Nerve growth factor) schüt-

zen enterische Neurone vor Apoptose. Außerdem stellen sie die Balance der extrazellulären Hämostase im ENS durch die Bereitstellung von Nährstoffen und Entsorgung von Abfallmetaboliten sicher (Heuckeroth et al. 1998; Cabarrocas et al. 2003; Hansebout et al. 2012). In einer In-vivo-Studie am Mausmodell konnten neuroprotektive Effekte auch für von enterischen Gliazellen bereitgestelltes Glutathion (GSH) nachgewiesen werden (Brown and Gulbransen 2018). Allerdings gibt es auch Grund zur Annahme, dass durch Inflammation aktivierte enterische Gliazellen über Connexin-43-Kanäle und NO zu neuronalem Zelltod führen können (Brown et al. 2016).

Eine weitere kritische Funktion betrifft die wechselseitige Kommunikation (engl. Crosstalk) des ENS mit dem Immunsystem. Hier nehmen enterische Gliazellen eine entscheidende Rolle ein. Diese können diverse Zytokine wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  oder Prostaglandin D2 selbst sezernieren oder durch diese aktiviert werden (Chow and Gulbransen 2017). Auch Interaktionen von EGC mit der adaptiven und angeborenen Immunantwort sind nachgewiesen. Beispielsweise können diese als Antigen-präsentierende Zellen für Leukozyten fungieren. Sie präsentieren im Besonderen nach Kontakt mit Bakterien Haupt-histokompatibilitätskomplex-Moleküle der Klasse II (engl. major-histocompatibility complex II molecules) (MHC II) und tragen somit zur Immunantwort des adaptiven Immunsystems bei (Geboes et al. 1992; da Silveira et al. 2011). Gruppe-3-innate lymphoide Zellen [engl. group 3 innate lymphoid cells (ILC3)] gelten im Intestinum als Regulatorzellen der angeborenen mukosalen Immunabwehr und sind über die Expression von Interleukin 22 und 17 während Inflammationsprozessen entscheidend an der Aufrechterhaltung der epithelialen Hämostase beteiligt. Enterische Gliazellen initiieren über die parakrine Sekretion von neurotrophen Faktoren die Expression von IL-22 in ILC3. Die Aktivierung der ILC3 erfolgt hierbei über den Ret-Rezeptor (Ibiza et al. 2016). Ferner können EGC durch die Sekretion des Neurotransmitters Substanz P eine Degranulation in Mastzellen induzieren (Neunlist et al. 2008).

Die Betrachtung der EGC im Zusammenhang mit CED und der damit verbundenen Interaktion mit Epithelzellen ist gegenwärtig ein viel diskutiertes Thema unter Barriere-Forschern und wird deshalb im nächsten Unterkapitel 1.4.4 ausführlicher dargestellt. An diesem Punkt lässt sich konstatieren, dass enterische Gliazellen eine zentrale Rolle in der

Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase und in der Immunabwehr spielen. Sie interagieren mit verschiedenen Zelltypen und reagieren mit einer gewissen Plastizität auf Entzündungsreize in ihrer Umgebung.

#### **1.4.4 Charakterisierung von enterischen Gliazellen im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Studien an Mausmodellen haben gezeigt, dass eine immunologische Ablation von enterischen Gliazellen, die immunologisch oder über den Promotor des GFAP-Gens vermittelt ist, zu einer schweren hämorrhagischen Jejuno-Ileitis führen. Die morphologischen Veränderungen der Darmwand der Mäuse ähneln hierbei dem histologischen Bild einer CED (Bush et al. 1998; Aube et al. 2006; Savidge et al. 2007). Daraus lässt sich schließen, dass ein funktionierendes Netzwerk aus enterischen Gliazellen für eine unbeeinträchtigte intestinale Barrierefunktion benötigt wird und dessen Verlust eine mögliche Rolle in der Pathophysiologie der CED einnimmt.

In neueren Studien mit transgenen Mausmodellen konnten dagegen keine akuten Effekte einer Gliazellablation auf die intestinale Barrierefunktion nachgewiesen werden, wohl aber auf die Darmmotilität (Rao et al. 2017) und Sekretionsfunktion des Darmepithels (Grubišić and Gulbransen 2017). Rao und Kollegen verwendeten bei ihrer Studie den Gliazellmarker Proteolipid Protein 1 (PLP-1) als Zielstruktur für die Ablation. Dieser weist zwar eine gute Co-Expression mit S100 $\beta$ -positiven Zellen auf, die Co-Expression mit GFAP-positiven Zellen ist jedoch stark limitiert (Rao et al. 2015). Doch gerade diese Subpopulation spielt, wie bereits im vorherigen Abschnitt dargelegt, bei entzündlichen Prozessen im ENS und ZNS eine tragende Rolle. Dies könnte als Hinweis auf die unterschiedlichen Funktionen von EGC-Subpopulationen gewertet werden, wird aber von Rao und Kollegen nicht weiter diskutiert (Rao et al. 2017). Grubišić und Gulbransen nutzten in ihrer Arbeit zwei verschiedene komplizierte Mausmodelle. Im ersten Modell abladieren sie keine EGC, sondern Ca<sup>2+</sup>-abhängige Connexin-43-Kanäle. Damit wurde selektiv die über diesen Weg verlaufende Kommunikation zwischen EGC untereinander und mit Neuronen blockiert. Im zweiten Modellansatz wurde eine über den GFAP-Promotor induzierbare pharmakologische Aktivierung der EGC verwendet. Die Ergebnisse zeigten,



dass die EGC-Aktivität die sekretomotorische Funktion beeinflusst, aber keine akuten Effekte auf die Permeabilität der Darmbarriere hat. Die Autoren versuchen die Diskrepanz zu vorhergehenden Studien damit zu erklären, dass Effekte auf Junctionsproteine womöglich eine längere Zeit in Anspruch nehmen als den Versuchszeitraum und gliale Connexin-43-Kanäle eine Rolle bei der chronischen Regulation der Darmbarriere spielen, indem über diese die Freisetzung von neurotrophen Faktoren gesteuert wird (Grubišić and Gulbransen 2017). Unterstützt wird diese These durch In-vitro-Studien an Zellmodellen, die barriestabilisierende Eigenschaften der von EGC sezernierten neurotrophen Faktoren beschreiben. So unterstützt rekombinantes GDNF nicht nur die Differenzierung von Enterozyten, sondern fördert auch die Wundheilung nach epithelialer Verletzung (Meir et al. 2015). GSNO (S-Nitrosoglutathion) mildert die Wirkung von Entzündungsmediatoren durch direkte Effekte auf Tight-Junction-Proteine ab (Cheadle et al. 2013). Auch für den von enterischen Gliazellen sezernierten Faktor 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE) konnten Pochard und Kollegen eine stabilisierende Wirkung auf die Epithelbarriere nachweisen und einen direkten Zusammenhang zu CED herstellen. So wurden EGC aus Biopsien von MC-Patienten isoliert und kultiviert. Diese zeigten eine signifikant geringere Expression an 15-HETE und hatten keine barriestabilisierenden Eigenschaften, verglichen mit EGC von Kontrollpatienten (Pochard et al. 2016).

Veränderungen der ENS-Struktur bei CED-Patienten konnten noch durch weitere Studien identifiziert werden (Villanacci et al. 2008). Als besonders interessant für die vorliegende Arbeit erweist sich in diesem Zusammenhang eine Publikation der Arbeitsgruppe um von Boyen. Diese analysierte strukturiert die Veränderungen der GFAP-Expression und das mukosale Sekretionsverhalten von GDNF in Colon-Biopsien von CED-Patienten. Bemerkenswert ist, dass sich die Ergebnisse hierbei für die beiden CED-Entitäten unterschieden. Proben von CU-Patienten zeigten sowohl in entzündeten als auch in nicht entzündeten Darmabschnitten eine vermehrte immunhistochemische GFAP-Expression mit einem verdichteten Glianetzwerk. Anhand von ELISA- und Westernblot-Messungen konnte zudem eine stark erhöhte mukosale Expression von GDNF in entzündeten Kolonabschnitten beobachtet werden. Im Kontrast dazu war das Glianzellnetzwerk in Proben von MC-Patienten in nicht entzündeten Kolonabschnitten ausgedünnt und die GDNF-Expression stark vermindert. Die entzündeten Kolonabschnitte der MC-Proben zeigten in den CU-Proben ähnliche, wenn auch nicht so stark ausgeprägte Tendenzen (von Boyen et al. 2011).

Das Gros der Studien bezüglich EGC und CED deutet auf einen engen Zusammenhang hin und auch ein Einfluss glialer Kommunikation auf die Integrität der Darmbarriere scheint mehr als wahrscheinlich. Die Frage nach der Pathogenese der CED ist aber nach wie vor nicht geklärt, wenngleich die Regulation der intestinalen Barrierefunktion neben anderen Faktoren einen hohen Stellenwert einzunehmen scheint.

### **1.5 GDNF und RET-Rezeptor**

Der GDNF wurde Anfang der Neunzigerjahre des letzten Jahrhunderts erstmalig charakterisiert, wobei auch seine Bedeutung für das Überleben von dopaminergen Neuronen im Mittelhirn während der Embryonalentwicklung beschrieben wurde (Lin et al. 1993). GDNF ist ein homodimeres Protein der Transforming growth factor beta (TGF $\beta$ )-Superfamilie. Jedes Monomer besitzt eine Größe von 15 kDa. Innerhalb der TGF $\beta$ -Superfamilie begründet GDNF mit den GDNF-family Ligands (GFL) einen eigenen Zweig, dem auch Neurturin, Persephin und Artemin angehören (Airaksinen and Saarma 2002).

Die GDNF-Signaltransduktion erfolgt überwiegend im Zusammenspiel mit dem protoonkogenen Multikomplexrezeptor RET. Der Komplex besteht aus der Tyrosinkinase RET und einem über einen Glykosylphosphatidinositol(GPI)-Anker in der Zellmembran fixierten GDNF-Familienrezeptor alpha (GFR $\alpha$ ). Zum jetzigen Zeitpunkt sind vier Unterarten (1-4) des GFR $\alpha$ -Ko-Rezeptors beschrieben. Ein GDNF-Dimer bindet zwei GFR $\alpha$ -Rezeptoren, woraufhin dieser Komplex zur Dimerisierung von zwei RET-Rezeptor-Tyrosinkinasen führt. Diese Aktivierung des Rezeptors hat eine Autophosphorylierung von intrazellulären Tyrosinresten (Tyr) zur Folge. Hierbei stehen die Tyrosinreste Tyr<sup>900</sup> und Tyr<sup>905</sup> am Anfang der Signalkaskade, wohingegen Tyr<sup>1062</sup> die zentrale Phosphorylierungsstelle für die Signalwege der Ras/MAP-Kinase sowie die Aktivierung der PI3/AKT-Kinasen darstellt (Ibáñez 2013b). Das Binden von GDNF an den RET-Rezeptor veranlasst zudem eine Inhibierung des p38-MAP-Kinase-Pfades (Meir et al. 2019), die über die PI3-Kinase vermittelt wird (Subramaniam et al. 2008). Eine hohe klinische Relevanz besitzt der RET-Rezeptor bei der Behandlung des kleinzelligen Lungenkarzinoms. Hierbei werden seit kurzer Zeit selektive RET-Inhibitoren wie Pralsetinib bei der Behandlung

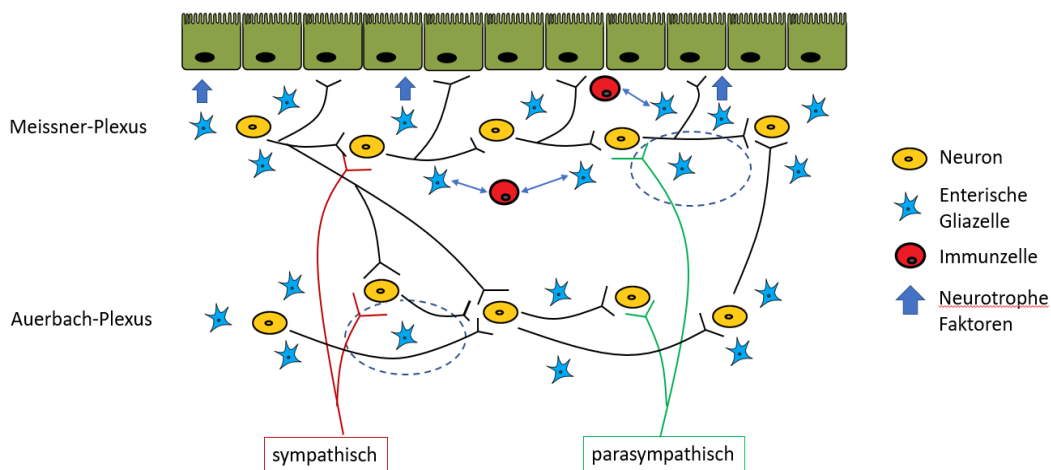


kinsonkrankheit positive Effekte einer GDNF-Behandlung auf das Überleben von dopaminergen nigrostriatalen Neuronen beobachtet werden, wohingegen bei der experimentellen Anwendung am Menschen bisher keine relevante Verbesserung des klinischen Outcomes erreicht werden konnte (d'Anglemont de Tassigny et al. 2015). Erste Erfolge auf diesem Gebiet wurden jedoch in einer Studie aus England erzielt. Hierbei wurde Parkinson-Patienten GDNF oder ein Placebo mittels eines am Schädel implantierten Port-Katheters direkt in das Putamen infundiert. PET-Scans des Gehirns zeigten nach dem primären Endpunkt der Studie (40 Wochen) einen um bis zu 100 % erhöhten Umsatz von  $^{18}\text{F}$ -Dopa in den betroffenen Hirnarealen der Probanden des GDNF-Arms. Signifikante klinische Verbesserungen des Outcomes gegenüber der Placebo-Gruppe konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (Whone et al. 2019).

Neben seinen neuroprotektiven Eigenschaften ist GDNF auch an einer physiologischen Entwicklung der Nieren und der Ausreifung der Spermatogonien involviert (Sariola and Saarma 2003). Auch konnten in mehreren Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen GDNF und gastroenterologischen Krankheitsbildern hergestellt werden. So entwickeln Mäuse mit genetischen Ablationen des RET-Rezeptorkomplexes, neben anderen Fehlbildungen, kein funktionierendes neuronales Netzwerk im Darm. Bemerkenswerterweise ist es dabei unerheblich, ob sich der genetische Knockout auf GDNF, den RET-Rezeptor oder den GFR1 $\alpha$ -Rezeptor bezieht (Cacalano, Fariñas, et al. 1998). Diese Ergebnisse werden von Studien an Patienten gestützt, die an der Erkrankung Morbus Hirschsprung leiden. Bei dieser Erkrankung kommt es durch eine segmentale Agangliose des Dickdarms und Rektums zu einer Motilitätsstörung des Darms mit einer deutlichen Dilatation des vorgeschalteten Darmsegments. Als eine der Ursachen des M. Hirschsprung wurden Mutationen im RET-Gen identifiziert (Tilghman et al. 2019). In mehreren Forschungsberichten wurde zudem ein direkter Zusammenhang zwischen GDNF und der intestinalen Barrierefunktion dargestellt. Hierbei sind sowohl anti-apoptotische Effekte als auch die positiven Eigenschaften des Proteins auf Junctionsproteine von Bedeutung. Auch konnte eine therapeutische Relevanz bei Colitiden an Mausmodellen festgestellt werden (Steinkamp et al. 2003; Zhang et al. 2010; Meir et al. 2015; Meir et al. 2019).

Als Quelle des neurotrophen Faktors müssen mehrere verschiedene Zell- und Gewebetypen genannt werden. So wird GDNF nicht nur von Gliazellen bzw. Neuronen im ZNS

und Intestinum (Chow and Gulbransen 2017; Duarte Azevedo et al. 2020) sezerniert, sondern auch von Enterozyten (Meir et al. 2015) und glatten Muskelzellen in der Darmwand (Han et al. 2015; Brun et al. 2015). Nebst dem setzen diverse Tumorzelllinien GDNF frei, wobei das Protein die Migration bzw. Invasion sowie das Überleben der Tumorzellen moduliert (Funahashi et al. 2005; Garnis et al. 2005; Mulligan 2019).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des ENS**

Das stark vereinfachte Schema verdeutlicht die wechselseitigen Beziehungen der verschiedenen Zelltypen des ENS mit der barrierebildenden Enterozytenschicht und Zellen des Immunsystems. EGC kommunizieren hierbei nicht nur direkt mit anderen Zelltypen, sondern modulieren auch die Reizweiterleitung innerhalb der Nervengeflechte.

*Quelle: Eigene Darstellung*

## 1.6 Fragestellung

Zusammenfassend nimmt die Interaktion zwischen Darmepithel und enterischen Gliazellen eine Schlüsselrolle ein, um die Integrität der Darmbarriere in Gesundheit und Krankheit zu modulieren. Einzelne neurotrophe Faktoren scheinen hierbei eine große Bedeutung innezuhaben. Die genauen Mechanismen und Schlüsselfaktoren dieser Interaktionen sind jedoch nicht bekannt. Daher wird sich in der vorliegenden Arbeit mit dem Einfluss des von EGC sezernierten neurotrophen Faktors GDNF sowie des dazugehörigen RET-Rezeptors auf die Integrität der Darmbarriere beschäftigt. Die Hypothese der Untersuchungen ist, dass GDNF für die Stabilisierung und Differenzierung der Darmbarriere eine spezifische Rolle spielt.

Im ersten Schritt sollen hierfür methodisch die Möglichkeiten der Messungen der intestinalen Barrierefunktion optimiert und eine Ko-Kultur aus enterischen Gliazellen und intestinalen Epithelzellen etabliert werden.

Im zweiten Schritt soll an diesem System untersucht werden, ob von EGC sezerniertes GDNF hauptverantwortlich für die barriestabilisierenden Eigenschaften der EGC auf das intestinale Epithel ist. Weiterhin gilt es zu eruieren, ob die barriestabilisierenden Eigenschaften von GDNF auch im Intestinum über den RET-Rezeptor-Komplex vermittelt werden.

Abschließend wird in einem translationalen Ansatz ermittelt, welchen Einfluss proinflammatorische Zytokine, die bei CED von Bedeutung sind, in diesem System ausüben. Hierfür werden Darmproben von MC- und CU-Patienten auf ihren GDNF-Gehalt hin analysiert, Gliazellen mit verschiedenen Entzündungsmediatoren behandelt und eine Entzündungsreaktion im Ko-Kultur-Modell durch den Entzündungsmediator TNF- $\alpha$  simuliert.

## 2. Material und Methoden

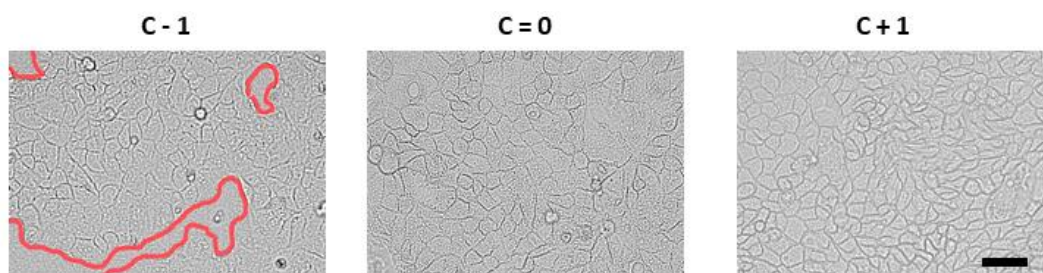
### 2.1 Ethik- und Tierversuchsvotum

Es wurde ausschließlich menschliches Gewebematerial verwendet, das bei Darmoperationen entnommen wurde, für die eine Indikation zur chirurgischen Resektion bestand. Vor der Operation gaben alle Patienten eine schriftliche informierte Einwilligung zur Aufnahme in die Studie. Die ethische Zustimmung wurde durch den Ethikrat der Universität Würzburg erteilt (Antragsnummern 113/13, 46/11, 42/16).

In der vorliegenden Arbeit wurde kein tierisches Gewebematerial verwendet.

### 2.2 Definitionen

**Konfluenz:** Beschreibt den Zustand von Epithelzellen, die sich in einem horizontalen Verband befinden, der geschlossen ist. Das heißt, es gibt keine Lücken mehr im Zellverband und die Zellen bedecken beispielsweise eine Petrischale oder einen Objektträger vollständig. Das Stadium C - 1 beschreibt den Zustand 24 Stunden vor Erreichen dieses Zustandes. Hier sind noch Lücken im Zellverband sichtbar und dieser ist erst zu 80–90 % geschlossen. Analog hierzu beschreibt das Stadium C + 1 den Zustand 24 Stunden nach Erreichen der Konfluenz, bei dem bereits ein fortgeschritten differenzierter Zell-Monolayer vorliegt.



**Abbildung 6: Konfluenzstadien von Caco2-Zellen**

Die Abbildung zeigt die für die Arbeit relevanten Konfluenzstadien der verwendeten Darmepithelzellen. Während links im Bild im C - 1-Stadium noch unbewachsene Lücken im Zellverband auszumachen sind (rote Markierung), sind diese bei Erreichen der Konfluenz (C = 0) geschlossen. 24 Stunden später (rechts im Bild) zeigt sich dann ein weiter differenzierter Monolayer (Maßstabsbalken = 100 µm).

*Quelle: Eigene Darstellung*

## **2.3 Material**

### **2.3.1 Testreagenzien**

Um den Einfluss von Störfaktoren zu minimieren, wurden für die Inkubation der Caco2-Zellen die unten genannten Testreagenzien mit Dulbeccos's Modified Eagles Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verdünnt, dem ausschließlich 50 U/ml Penicillin-G und 50 µg Streptomycin (P/S) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zugesetzt wurde. Die Inkubationszeit betrug, falls nicht anders angegeben, 24 Stunden.

#### **2.3.1.1 GDNF**

Für die Versuchsreihen wurde rekombinant hergestelltes GDNF (rGDNF) der Firma PeproTech (Rock Hill, USA) verwendet. Die gewählte Konzentration von 100 ng/ml orientierte sich hierbei an bereits publizierten Daten (Meir et al. 2015; Bergauer 2017). Das kalkulierte Molekulargewicht beträgt laut Herstellerangaben 30,4 Kilodalton (kDa).

#### **2.3.1.2 TNF- $\alpha$**

Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  ist entscheidend an der Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems beteiligt. Die pleiotropen Effekte beinhalten sowohl eine schützende Wirkung bei Inflammation und der Wirtsabwehr als auch einen schädigenden Einfluss bei Autoimmunerkrankungen, chronischen Entzündungen, Kachexie oder septischen Krankheitsbildern (Hehlhans and Pfeffer 2005). Um eine Entzündungsreaktion zu simulieren, fiel die Wahl auf das Zytokin TNF- $\alpha$ , da dieses eines der Schlüsselzytokine bei CED ist (Shah and Mayer 2010) und die Inkubation mit TNF- $\alpha$  mit einer Konzentration von 100 ng/ml ein gut etabliertes Inflamationsmodell bei In-vitro-Versuchen darstellt (Schmitz et al. 1999). Das verwendete TNF- $\alpha$  wurde von der Firma Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland) bezogen.



### 2.3.1.3 LPS

LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) sind ein Membranbestandteil von gramnegativen Bakterien. Die Verbindung aus fettähnlichen und Zuckerbestandteilen wirkt als Endotoxin und begünstigt den Unterhalt von systemischen Inflammationsprozessen. Die verwendete Konzentration von 100 ng/ml orientiert sich an bereits publizierten Daten von In-vitro-Experimenten mit Endothelzellen (Flemming et al. 2015).

### 2.3.1.4 LTA-SA

Der Agonist des Toll-like-Rezeptors 2 (TLR2) Lipoteichoensäure aus Staphylokokkus aureus (LTA-SA) (InvivoGen, San Diego, USA) wurde in einer Konzentration von 500 ng/ml verwendet. In In-vivo-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass dieser die Produktion von GDNF in glatten Muskelzellen des Mäusedarms reguliert (Brun et al. 2015).

### 2.3.1.5 Blue 667

Der RET-Inhibitor Blue 667 (Pralsetinib) (MedChemExpress, Monmuth Junction, USA) hemmt spezifisch die Phosphorylierung von Wildtyp- und onkogenen RET-Varianten (Subbiah et al. 2018). In von uns durchgeführten Dosis-Wirkungs-Experimenten mit Caco-2-Zellen wurde eine wirksame Hemmung der für die GDNF-Signaltransduktion relevanten RET-Phosphorylierungsstelle RET<sup>Y1062</sup> bei Konzentrationen von 533 ng/ml (1 µM) festgestellt.

## 2.3.2 Antikörper

**Tabelle 1: Antikörper indirekte Immunfluoreszenz**

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Bestellnummer
------------	------------	------------	---------------

<b>Primärantikörper</b>			
Desmoglein 2 (rb)	Milipore	1:100	ABT-181
E-Cadherin (rb)	BD	1:100	610182
Claudin 1 (m)	Thermo Fisher	1:50	37-4900
Claudin 5 (m)	Invitrogen	1:50	34-1600
<b>Sekundärantikörper</b>			
Ziege gegen Maus (gamcy3)	Dianova	1:600	115-165-003
Esel gegen Maus (dam Alexa Fluor 488)	Invitrogen-Ther-mofisher	1:200	A-21201

**Tabelle 2: Antikörper Western Blot**

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bestellnummer</b>
<b>Primärantikörper</b>			
a-GDNF	R&D Systems	1:200	AF-212-NA
a-RET	Abcam	1:700	Ab184189
a-p-RET <sup>Tyr905</sup>	Cell Signaling	1:500	3221
a-p-RET <sup>Y1062</sup>	R&D Systems	1:500	AF5009
a-Vimentin	Abcam	1:500	Ab8978
a-β-Actin-Peroxidase	Sigma-Aldrich	1:10000	A3854
a-pp38	Cell Signaling	1:1000	9211

a-p38	Cell Signaling	1:1000	9212
a-GFR $\alpha$ 1	Abcam	1:1000	Ab186855
a-GFR $\alpha$ 2	Abcam	1:1000	Ab19146
a-GFR $\alpha$ 3	Abcam	1:1000	Ab89343
<b>Sekundärantikörper (POX-gekoppelt)</b>			
Ziege gegen Maus (gam pox)	Dianova	1:2000	115-035-003
Ziege gegen Kaninchen (garb pox)	Dianova	1:2000	111-035-003
Ziege gegen Kaninchen (garb pox-cs)	Cell Signaling	1:1000	7074 S
Esel gegen Ziege (dag pox)	Dianova	1:1000	705-035-003

### 2.3.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Neben den bereits tabellarisch aufgeführten an spezifische Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen wurde DAPI(4',6 Diamidin-2-phenylindol) (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Der Einsatz erfolgte, um bei der Fluoreszenzmikroskopie Zellkerne anzufärben. Die Verbindung lagert sich an Arginin- und Thymidin-reiche DNA-Sequenzen an und erstrahlt blau bei der Anregung durch ultraviolettes Licht (Kapuscinski 1995).

### 2.4 Zellkultur

Als Grundlage der vorliegenden Arbeit dienen drei verschiedene Zellkulturlinien für In-vitro-Versuchsreihen: zwei verschiedene Klone-Caco-2-Zellen (ATCC, Wesel und Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) und ein Klon

CRL2690 (ATCC, Wesel). Caco-2-Zellen wurden in den Siebzigerjahren des letzten Jahrhunderts ursprünglich aus einem menschlichen kolorektalen Adenokarzinom gewonnen. In der Zellkultur durchlaufen sie einen spontanen Differenzierungsprozess, sodass es zur Ausbildung eines Enterozytenmonolayers kommt. Neben der für Enterozyten typischen zylindrischen und polarisierten Morphologie bilden die Zellen apikale Mikrovilli und Verschlusskontakte aus (Sambuy et al. 2005). Hierdurch qualifizieren sich Caco-2-Zellen als häufig verwendetes Modell zur Untersuchung der intestinalen Barriere.

CRL2690-Zellen sind eine enterische Gliazelllinie der Ratte. Die Isolierung aus dem jejunalen Plexus myentericus erfolgte 1999 (Ruhl et al. 2001). Die Zellen exprimieren die typischen Gliazellmarker: GFAP, S100 $\beta$  sowie Vimentin. In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich die Expression und Sekretion von GDNF sowie das Vorhandensein des RET-Rezeptors und der GDNF-Rezeptoren 2 und 3 verifiziert.

#### **Routinekultur:**

Die Kultivierung beider Zelllinien erfolgte mit DMEM. Dieses wurde mit zehnpromzentigem fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin, Deutschland) sowie 50 U/ml Penicillin-G und 50  $\mu$ g Streptomycin (P/S, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) versetzt. Das Wachstum der Zellen erfolgte in T-75-Zellkulturflaschen in einem Brutschrank (Heracell 150, Thermofisher, Darmstadt, Deutschland) bei 37 °C und einer Atmosphäre mit 80 % Luftfeuchtigkeit sowie 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung. Da FCS selbst GDNF erhält, wurde für die einzelnen Versuche während der Inkubation auf die Supplementierung von FCS 24 h vor Versuchsbeginn verzichtet.

Um einer Kontamination der Zellkulturen vorzubeugen, wurden sämtliche Arbeiten an den Kulturen unter einer sterilen Werkbank durchgeführt (Hera safe, Thermofisher Scientific, Waltham, USA). Die Arbeitsfläche wurde regelmäßig nach Beendigung der Arbeit sorgfältig mit Terralin Liquid® (Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland) desinfiziert. Alle Geräte und Instrumente, die keine sterilen Einmalprodukte waren, wurden vor direktem Kontakt mit den Zellen bei 180 °C autoklaviert.

#### **Passagierung und Aussaat:**

Die Passagierung (engl. Splitting) und Aussaat der Zellen erfolgten in einem wöchentlichen Rhythmus. Die für die Experimente benötigten Zell-Behältnisse wurden vor dem

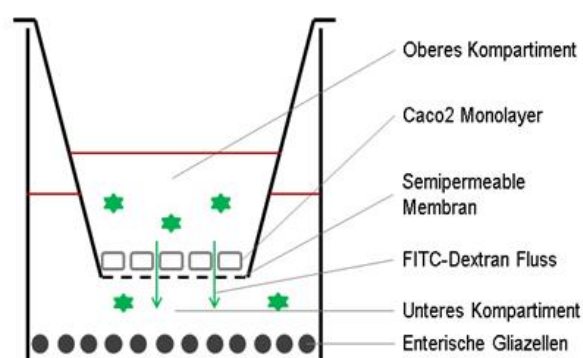
Überführen der Zellen gelatiniert, da die Zellhaftung an Oberflächen dadurch maßgeblich verbessert wird. Hierzu wurden die Behältnisse für 30 Minuten mit 0,5 % Gelatine bedeckt und anschließend abgesaugt. Nachfolgend wurde das Zellmedium vorgelegt und die Zellen wurden überführt. Das wöchentliche Splitten der Zellen erfolgte für die Caco-2-Zellen im Verhältnis 1:20 und für die CRL2690-Zellen im Verhältnis 1:40. Eine Konfluenz in den verwendeten T-75-Zellkulturflaschen für die Routinekultur wurde nach sechs bis sieben Tagen erreicht. Die ausgesäte Zellzahl für einzelne Versuchsreihen ist dem jeweiligen Experiment zu entnehmen.

## **2.5 Zellbiologische Methoden**

### **2.5.1 Permeabilitätsmessung mithilfe des Transwell-Filtersystems im Ko-Kultur-Modell**

Ein Transwell-Assay stellt eine Möglichkeit dar, um die Permeabilität einer Epithelbarriere zu beurteilen. Hierbei wird der Durchfluss eines fluoreszierenden, größendefinierten Farbstoffes durch eine semipermeable Membran sowie eine Epithelzellschicht gemessen. Es handelt sich hierbei um eine Endpunktmessung. Caco-2-Zellen wurden auf semipermeable Filter (0,4 µm Porengröße; Falcon, Heidelberg) ausgesät ( $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml DMEM) und anschließend einen Tag im Brutschrank inkubiert. Zeitgleich erfolgte die Aussaat von EGC auf 12-Well-Platten ( $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml DMEM), die ebenfalls einen Tag im Brutschrank inkubiert wurden. Nach 24 Stunden erfolgte dann die Zusammenführung der Zelllinien. Durch das Einbringen der Filter in die Vertiefung der 12-Well-Platte entstanden so zwei voneinander getrennte Kompartimente, mit enterischen Gliazellen im unteren und Caco-2-Zellen im oberen Kompartiment. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem 500 µl frisches DMEM (5 % P/S, ohne FCS) dem oberen Kompartiment und 1600 µl dem unteren Kompartiment hinzugefügt wurden. Die Inkubation der Zellen erfolgte bis zur Konfluenz der Caco-2-Zellen ( $C = 0$ ), was im Schnitt weitere 2 Tage beanspruchte. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Filter sowie 12-Well-Platten wurden vorsichtig mit farblosem DMEM (5 % P/S, ohne FCS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) dreimal gewaschen. Dieser Schritt ist notwendig zum Entfernen von Phenolresten und etwaigen Zelleichen, um die spätere Fluo-

reszenzmessung nicht zu verfälschen. Nach erfolgter Waschung wurden die Kompartimente wieder mit farblosem DMEM befüllt (500 µl oben, 1600 µl unten). Zusätzlich wurden dem oberen Kompartiment 100 µl FITC (Fluorescein Isothiocyanat)-Dextran mit einer Molekülgröße von 4 kDA in der Verdünnung 10 mg/ml (in PBS) zugefügt. Sofort danach erfolgte die erste Probenentnahme von 50 µl aus dem oberen Kompartiment (Zeitpunkt 0), die mit 50 µl farblosem DMEM verdünnt und auf eine 96-Loch-Platte aufgetragen wurde. Die nachfolgenden Probenentnahmen erfolgten mit 100 µl aus dem unteren Kompartiment im Abstand von 30-Minuten-Schritten und wurden nicht verdünnt. Es wurden bis 2 Stunden nach dem Nullwert Proben entnommen. Während des Assays wurde die 96-Loch-Platte lichtgeschützt aufbewahrt, während die 12-Well-Platte mit den Filtereinsätzen sanft auf einem Schüttler (Typ 3017, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland) bei 37 °C bewegt wurde. Nach der letzten Probenabnahme wurde die Fluoreszenz der 100 µl Aliquots, der 96-Loch-Platte mit einem Spectrophotometer (Tecan GENios Microplate Reader, MTX Lab systems, Bradenton, USA) bei einer Exzitation von 485 nm und der Emission von 535 nm gemessen. Die Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten ( $P_E$ ) erfolgte anschließend nach folgender Formel (Hollander 1999):  $P_E = [(\Delta C_A / \Delta t) \times V_A] / S \times \Delta C_L$ ,  $P_E$  = Permeabilitätskoeffizient (cm/s),  $\Delta C_A$  = Veränderung der FITC-Dextran-Konzentration,  $\Delta t$  = Voranschreiten der Zeit,  $V_A$  = Volumen des fluoreszierenden Mediums,  $S$  = Oberfläche,  $\Delta C_L$  = konstante luminale Konzentration.



**Abbildung 7: Transwell-Filter**

Schematische Abbildung des Transwell-Filtersystems. FITC-Dextran wird in das obere Kompartiment eingebracht und anschließend werden alle 30 Minuten Proben aus dem unteren Kompartiment entnommen, um den Durchfluss von FITC-Dextran durch den Caco-2-Monolayer zu messen.

*Quelle: Eigene Darstellung*

### **2.5.2 Messung des transepithelialen Widerstandes**

Im Gegensatz zu Endpunkt-Assays findet bei der Messung des transepithelialen Widerstandes [engl. transepithelial electric resistance (TEER)] eine kontinuierliche Messung der Barrierefunktion statt. Das dabei verwendete ECIS(Electric Cellsubstrate Impedance Sensing)1600R-Gerät (Applied BioPhysics Inc., USA) misst zeitaufgelöst die Spannung über zellbedeckte Impedanzelektroden bei einem angelegten Strom von 1  $\mu$ A bei 400 Hz (Meir et al. 2015).

Durch Adhärenz und das Ausbilden von Zell-Zell-Kontakten wird der Stromfluss zwischen der Elektrode und dem Medium zunehmend erschwert, sodass der Wechselstromwiderstand steigt. Die Änderungen der parazellulären Permeabilität werden dann in den Varianzen der gemessenen Impedanz abgebildet (Rädler and Wegener 2009; Srinivasan et al. 2015).

Es erfolgte die Aussaat von  $10^6$  Caco-2-Zellen pro Well auf einer ECIS-8-Well-Platte mit Goldfilmelektroden. Pro Well waren insgesamt 40 Goldfilmelektroden verarbeitet, über die die Messung erfolgte. Nach der Aussaat in 400  $\mu$ l Zellsuspension wurde eine Setzzeit von vier Stunden abgewartet und anschließend die Messung für 30 Stunden gestartet. Bei dem verwendeten Medium handelte es sich entweder um DMEM (5 % P/S, ohne FCS) (Kontrollgruppe) oder DMEM (5 % P/S, ohne FCS) mit konzentriertem Zellüberstand oder verschiedenen Reagenzien (Interventionsgruppen).

### **2.5.3 Herstellung von Zell-Lysaten**

Um Western-Blot- und ELISA-Untersuchungen durchführen zu können, mussten Gewebeproben und geerntete Zellen erst zu Lysaten verarbeitet werden. Dieser Vorgang wird nachfolgend für beide Gruppen beschrieben.

### **2.5.3.1 Herstellung von Zelllysaten**

Caco-2-Zellen und EGC wurden in 6-Well-Kulturplatten (Cellstar, greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich) ausgesät, nachdem diese mit 0,5 % Gelatine beschichtet wurden. Die Zellzahl bei Aussaat betrug  $1 \times 10^6$ . Diese wurde mit einer Zellzählkammer bestimmt. Anschließend erfolgte die Kultivierung in einem Brutschrank bis zum Erreichen der Konfluenz. Daran schloss sich eine Inkubation mit Mediatoren oder Zellkulturüberstand für 24 Stunden an. Nach dem Verstreichen der Zeit wurden die Zellen einmalig mit phosphathaltiger Pufferlösung (PBS) gewaschen. Nach der Zugabe von 150  $\mu$ l Lysepuffer [25mm ol/L HEPES-Puffer (pH 7,6), 2 mmol/L Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 25 mmol/L einprozentiges Sodium dodecyl sulfate (SDS)] und Halt<sup>TM</sup>-Protease-Inhibitor-Cocktail im Verhältnis 1:100 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) wurden die Zellen abgeschabt und in 1,5-ml-Eppendorf-Gefäße (Hamburg, Deutschland) überführt. Vor der Weiterverwendung wurden die Proben sonifiziert und mit einem Vortexgerät (MSI Minishaker, IKA, Staufen, Deutschland) bearbeitet. Anschließend konnten die Ly-sate direkt für Versuche benutzt oder bei -20 °C gelagert werden.

### **2.5.3.2 Herstellung von Lysaten aus Gewebeproben**

Die Proben von Patienten mit MC stammten alle aus dem terminalen Ileum. Nach der Entnahme im Operationssaal wurden diese in das Schnellschnittlabor der Universitätsklinik Würzburg gebracht und von einem Pathologen begutachtet. Durch diesen erfolgte die Gewebeentnahme eines circa 3 x 3 cm großen Abschnittes aus dem Zentrum des entzündeten Areals und aus der Peripherie, die makroskopisch entzündungsfrei war. Bei Patienten mit Colitis Ulcerosa wurde ähnlich verfahren. Da bei diesen Patienten zumeist der gesamte Dickdarm entzündet war, konnte jedoch kein makroskopisch nicht entzündetes Gewebe entnommen werden.

Kontrollgewebeproben (Kolon oder terminales Ileum) stammten von Patienten, die nicht an einer CED oder anderen inflammatorischen Darmerkrankung litten. Bei diesen war zumeist aufgrund eines Kolonkarzinoms eine Hemikolektomie rechts erforderlich, bei der



die chirurgische Resektion routinemäßig einen Teil des gesunden Dünndarms bzw. Kolons involviert. Detaillierte Daten zu den Patientencharakteristika sind tabellarisch im Anhang dargestellt.

Die Weiterverarbeitung der Proben erfolgte unmittelbar nach der Begutachtung durch den Pathologen. Die Proben wurden mit einem chirurgischen Skalpell in sechs bis sieben gleich große Gewebestücke zerteilt. Für eine getrennte Analyse der Mukosa und des Vollwandgewebes erfolgte zu diesem Zeitpunkt eine Mukosa-Dissektion bei einem Teil der Proben durchgeführt. Hierfür wurden die Proben mit einer Pinzette fixiert und mit einem Skalpell wurde die Schleimhaut vom Rest des Darmgewebes abgeschabt. Das Skalpell wurde dafür in einem 45 °-Winkel zur Horizontalen geführt. Anschließend erfolgte die Schockfrostung des Gewebe für Western-Blot- und ELISA-Analysen in flüssigem Stickstoff und eine anschließende Lagerung bei -80 °C. Die verbleibenden Gewebeproben wurden in Paraformaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend mit einem Mikrotom sektioniert (1 µm).

Die Verarbeitung zu Lysaten erfolgte bei Vollwand- und Mukosa-Gewebe gleichermaßen. Die Proben wurden aufgetaut und anschließend in 2-ml-Eppendorf-Gefäße überführt. Danach erfolgte die Zugabe von 500 µl Gewebelysepuffer (Tris ultrapure 1,212 g, NaCl 4 g, EDTA 0,3723 g, TritonX 100 5 ml, Glycerol 50 ml, ad 500 ml Aqua Dest. bei pH 8) und einer 5 mm großen Stahlkugel (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland). Anschließend wurde das Gewebe für 20 Minuten bei einer Frequenz von 30/s in einem Tissue Lyser (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) zerkleinert und lysiert. Danach wurden die Eppendorf-Gefäße für eine Minute bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in 1,5-ml-Eppendorf-Gefäße abpipettiert und in einem Verhältnis von 1:100 mit Halt<sup>TM</sup>-Protease-Inhibitor versetzt. Die Stahlkugeln und etwaige Gewebereste wurden verworfen. Anschließend erfolgte die Sonifizierung und Lagerung der aufbereiteten Proben bei -20 °C.

#### **2.5.4 Western Blot**

Mit einer Western-Blot-Untersuchung kann eine semiquantitative Untersuchung bestimmter Proteine vorgenommen werden. Sie teilt sich in die Schritte Auftrennung,

Transfer und den schlussendlichen Nachweis eines spezifischen Proteins auf (Renart et al. 1979).

#### **Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration:**

Um bei der Auftrennung der Proteine in der späteren Gelelektrophorese äquivalente Proteinmengen auftragen zu können, wurde mit Hilfe der Bicinchinon-Säure-Methode (engl. Bicinchoninic Acid, BCA) der Proteingehalt jeder einzelnen Probe ermittelt. Hierfür wurde ein Kit der Firma ThermoFisher scientific (Waltham, USA) verwendet. Die Konzentrationsermittlung erfolgte über ein Spektralphotometer (Dynatech Laboratories MRX Microplate Reader, El Paso, USA) bei einem Absorptionsmaximum von 595 nm. Für die definitive Konzentrationsbestimmung wurde über einen Proteinstandard eine Kalibrierungsgerade erstellt.

#### **Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE):**

Eine Auftrennung der im Lysat enthaltenen Proteine erfolgte durch die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970). Bei dieser Methode werden die verschiedenen Laufgeschwindigkeiten von Proteinen in einer Gelmatrix aus Acrylamid und Bisacrylamid im elektrischen Feld genutzt. Die Laufgeschwindigkeit wird hierbei durch die Größe des Proteins bestimmt. Das zugesetzte anionische Detergenz SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine in der Probe und es kommt simultan zu einer Auflösung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Aminosäureketten. Die Vorbereitung der Proben erfolgte mit einem vierfach konzentrierten Probenpuffer, der SDS und Glycerin enthält. Durch das Glycerin bewirkt dieser eine Dichterrhöhung der Probe und damit ein späteres Absinken in den Geltaschen. Durch den Zusatz des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) (PanReacAppliChem, Darmstadt, Deutschland) werden Disulfidbrücken zwischen Aminosäuren gebrochen. Das kurzzeitige Erhitzen der Proben (5 Minuten) auf 95 °C verstärkt dabei die Denaturierung der Proteine. Da eine einheitliche negative Ladung zum Molekulargewicht proportional ist, wandern die SDS-Proteinkomplexe in der polymerisierten Gelmatrix nach Anlegen einer Spannung unterschiedlich schnell zur Anode und werden entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Kleinere Proteine bewegen sich schneller und erscheinen bei Abschluss der Gelelektrophorese weiter unten im Gel.

Es kamen Zwei-Komponenten-Gele (NuPage 4–12 % Bis-Tris-Gel) von Thermo Fisher scientific (Waltham, USA) zum Einsatz. Die Gelplatten wurden in die mit einfach konzentriertem MOPS SDS Running Buffer (ThermoFisher, Darmstadt, Deutschland) gefüllte Elektrophoresekammer (Novex MiniCell, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) eingespannt. Bei diesen sogenannten Gradienten-Gele erfolgt im ersten Abschnitt des Gels (Sammelgel) eine Konzentrierung der Proteine, während im zweiten Abschnitt (Trenngel) die Proteinfractionen aufgetrennt werden. Vor dem Anlegen der Spannung wurde in mindestens eine Geltasche ein Proteinmarker für die Größenordnung der getrennten Proteine aufgetragen. Die weiteren Geltaschen wurden mit einem 1:1-Gemisch aus 4-fach-Probenpuffer mit zugesetztem DTT und Zell-Lysat beladen. Zu Beginn der Gelelektrophorese wurde eine Spannung von 120 Volt angelegt. Nach circa 20 Minuten war die farblich markierte Lauffront in das Trenngel übergetreten und die Spannung wurde auf 175 Volt erhöht. Nun wurde abgewartet, bis der Farbstoff aus dem Gel herauslief. Danach wurde die Gelplatte aus der Kammer herausgenommen und der Immunoblot vorbereitet.

#### **Proteintransfer mittels Western Blot:**

Die nach Größe aufgetrennten Proteine im Gel wurden nun positionsäquivalent auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und immobilisiert. Diese Methode entspricht der Southern-Blot-Technik nach Towbin, wobei die Proteine mithilfe einer zweiten Elektrophorese auf das Nitrocellulose-Papier übertragen werden. Dies erfolgte im Nass-Blot-Verfahren und das erneute Anlegen einer Spannung in einer im Gegensatz zur ersten Gelelektrophorese nicht mehr vertikalen, sondern horizontalen Blot-Kammer (Towbin et al. 1979).

Der Ablauf dieser Technik gliedert sich wie folgt: Zuerst wurde eine Nitrocellulose-Membran mit den Maßen 8,5 x 13,5 cm und der Porengröße 0,2 µm (life technologies, Carlsbad, USA) zwischen zwei Filterpapiere (sog. Whatmanpaper) gelegt und anschließend für 3 Minuten in Blot-Puffer (Nupage, life technologies, USA) getränkt. Danach erfolgte die Positionierung des Gels auf der Nitrocellulose-Membran, die im Anschluss zwischen die beiden Whatmanpaper gelegt wurde. Das gesamte Paket wurde nun zwischen zwei Schwämme in einer Siebvorrichtung in der Blot-Kammer (Peqlab, Erlangen, Deutschland) positioniert. Die Ausrichtung des Gels erfolgte zur Kathode, und jene der Nitrocellulose-Membran zur Anode, um der Wanderungsrichtung der Proteine Folge zu

leisten. Durch das Anlegen einer Stromstärke von 200 mA wanderten die Proteine entlang des elektrischen Feldes aus dem Gel heraus auf die Nitrocellulose-Membran. Dieser Vorgang dauerte je nach Proteingröße 45 bis 60 Minuten und wurde im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt.

### **Detektion durch proteinspezifische Antikörper:**

Um nach dem Transfer unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und den spezifischen Antikörpernachweis zu ermöglichen, wurde die Membran für eine Stunde in PBS mit 5 % Magermilchpulver und 0,05 % Polyethylenglykol-Sorbitan-Fettsäureester (Tween) inkubiert.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit verschiedenen Primärantikörpern im Kühlraum bei 4 °C. Die Antikörper wurden in der oben genannten Blockierungslösung gelöst (Verdünnung siehe Antikörpertabelle) und über Nacht auf einem Schüttler (Unimax 1010, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) positioniert, um eine gleichmäßige Benetzung der Membran zu gewährleisten. Nach erfolgter Inkubation wurde die Nitrocellulose-Membran dreimal für fünf Minuten mit PBS mit 0,05 % Tween gewaschen und anschließend mit den entsprechenden an Meerrettich-Peroxidase (POX) gekoppelten Sekundärantikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Wiederholung der Waschschritte erfolgte die Detektion der Enzym-Antikörper-Komplexe. Hierfür wurde die Membran für zwei Minuten in einer Luminol- und Wasserstoffperoxid-haltigen Belichtungslösung (ECL-Lösung 1 und 2 im Verhältnis 1:1, PanReacAppliChem, Darmstadt, Deutschland) getränkt. Bei dieser Methode katalysiert die gebundene POX in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Umwandlung von Luminol in seine oxidierte Form: lichtemittierendes Carbonyl. Die Belichtung und Digitalisierung der Membran wurden anschließend mit einer automatisierten Entwicklermaschine (ChemiDoc™ MP Imaging System, BioRad, Hercules, USA) vorgenommen. Zur Auswertung wurde die Image-Lab-Software von BioRad herangezogen. Mit Ausnahme der qualitativen Proteinbestimmung können hierbei durch den Vergleich der Größe und Intensität der Banden auch semiquantitative Aussagen über die Proteinmenge getroffen werden. Als Ladungskontrolle wurden Primärantikörper gegen das Strukturprotein  $\beta$ -Actin verwendet und wie oben beschrieben inkubiert.

### 2.5.5 ELISA

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) stellt ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren dar und basiert auf einer enzymatischen Farbreaktion, mit deren Hilfe Konzentrationen von Antigenen bestimmt werden können. Die Messung von Konzentrationen wird hierbei durch das Verwenden einer Kalibrierungskurve möglich. Das Prinzip dieser Methode wurde im Jahr 1971 von Eva Engvall und Peter Perlmann in Stockholm entwickelt (Engvall and Perlmann 1971).

Bei den durchgeführten Versuchen wurde ein humaner GDNF Sandwich ELISA (Abnova, Heidelberg, Deutschland) mit einer unteren Detektionsgrenze von 4 pg/ml und einer Kalibrierungsspannweite von 31,2 pg/ml bis 2000 pg/ml verwendet.

Die Herstellung der Lysate und Messung der Gesamtproteinkonzentration wurden nach den unter Punkt 2.5.3 beschriebenen Methoden durchgeführt. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die Gewebelysate nach einer BCA-Messung auf eine einheitliche Proteinkonzentration von 1 mg/ml mit Gewebelysepuffer verdünnt.

#### **Prinzip des Assays:**

Der verwendete ELISA basiert auf der Sandwich-ELISA-Technologie. Hierbei wird ein monoklonaler Antikörper spezifisch gegen GDNF auf eine 96-Well-Platte beschichtet. Anschließend erfolgt das Auftragen der zu untersuchenden Proben sowie des Test-Standards.

#### **Herstellung des Proteinstandards:**

Die benötigten Konzentrationen des Proteinstandards zur Erstellung einer Kalibrierungskurve wurden durch eine Verdünnungsreihe mithilfe der mitgelieferten GDNF-Standardlösung (10.000 pg/ml) und dem im Kit ebenfalls enthaltenen Probenpuffer hergestellt:

**Tabelle 3: Verdünnungsreihe**

<b>Zielkonzentration</b>	<b>Proteinstandard (Volumen und Konzentration)</b>	<b>Probenpuffer</b>
10.000 pg/ml	10.000 pg/ml	1 ml

2000 pg/ml	200 µl (10.000 pg/ml)	800 µl
1000 pg/ml	300 µl (2000 pg/ml)	300 µl
500 pg/ml	300 µl (1000 pg/ml)	300 µl
250 pg/ml	300 µl (500 pg/ml)	300 µl
125 pg/ml	300 µl (250 pg/ml)	300 µl
62,5 pg/ml	300 µl (125 pg/ml)	300 µl
31,25 pg/ml	300 µl (62,5 pg/ml)	300 µl

### **Durchführung des Assays:**

Als erstes wurden der Proteinstandard und die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur equilibriert. Anschließend wurden die Gewebelysate oder Zellkulturüberstände im Verhältnis 1:3 (40 µl Probe + 80 µl Probenpuffer) verdünnt. Danach wurden jeweils 100 µl verdünnte Probe und Proteinstandard als Duplikate in die Vertiefungen der ELISA-Platte aufgetragen. Zusätzlich erfolgte noch das Auftragen eines Nullwertes. Die Platte wurde danach mit dem mitgelieferten Plattenversiegler verschlossen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Abdeckung entfernt und die Platte auf einem Zellstofftuch entleert. Hierbei war darauf zu achten, dass es zu keiner vollständigen Trocknung kam. Danach wurden 100 µl des vorgefertigten biotinylierten humanen GDNF-Antikörpers je Well zugegeben. Nach einer erneuten Versiegelung wurde der Antikörper für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation des Antikörpers wurde die Platte ein weiteres Mal auf einem Zellstofftuch entleert und anschließend zweimal mit dem mitgelieferten Waschpuffer gereinigt. 100 µl des vorgefertigten Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes wurden je Well hinzugefügt und für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der wiederholten Entleerung der Platte erfolgte die Zugabe von 300 µl Waschpuffer je Vertiefung. Dieser Schritt wurde insgesamt fünfmal wiederholt, bevor 90 µl Farbreagenz in jedes Well pipettiert wurden. Nach einer lichtgeschützten Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Farbreaktion durch die Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung je Well gestoppt, woraufhin die Farbe der Lösung unmittelbar in einen gelben Farbton umschlug. Nach weiteren 30 Minuten Stoppreaktion wurde die Extinktion der Lösung mit einem Mikropplatten-Spektralphotometer (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) bei 450 nm gemessen.

### **2.5.6 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie**

Die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie ermöglicht eine Visualisierung und Beurteilung von spezifisch markierten Proteinen in Zellen. Hierdurch lassen sich Rückschlüsse auf die Konzentration und Verteilung der Proteine in den untersuchten Zellen ziehen. Das Prinzip dahinter ist die spezifische Bindung eines Primärantikörpers an Zielstrukturen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der an den Fc-Teil der gebundenen Primärantikörper bindet. Die Kopplung des Sekundärantikörpers an einen Fluoreszenzfarbstoff ermöglicht eine Anregung durch Lichtstrahlen spezifischer Wellenlängen, wodurch dieser selbst zum Strahlen angeregt wird und Licht im sichtbaren Farbspektrum emittiert. Die verwendeten Farbstoffe leuchten beispielsweise rot (Cyan3), grün (Alexa Fluor 488) oder blau (DAPI).

Die Aussaat für die sekundäre Immunfluoreszenz erfolgte mit jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen auf Transwell-Filtern oder 12 mm Ø messenden gelatinisierten Deckgläschen. Folgend wurden die Zellen, je nach Versuch, mit DMEM (10 % FCS, 5 % P/S) in der Ko-Kultur bis zum Erreichen der Konfluenz (drei bis vier Tage) oder ohne Ko-Kultur bis zum Stadium einen Tag vor Erreichen der Konfluenz (C - 1) inkubiert. In der Ko-Kultur erfolgte die Färbung nach Durchführung eines Transwell-Assays. Ohne Ko-Kultur wurden die Zellen vor der

Färbung noch für 24 Stunden mit Zellkulturüberstand oder Mediatoren behandelt. Der Inkubation schlossen sich in beiden Fällen die folgenden Schritte an: Zuerst wurde das vorhandene Zellmedium abgesaugt und die Zellen für dreimal 5 Minuten vorsichtig mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 2 % Paraformaldehydlösung (PFA) für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Auf einen dreimaligen Waschschrift mit PBS folgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,1 % Triton-X 100 (in PBS) für 15 Minuten. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen bzw. der Boden der Transwell-Filter auf Objektträger überführt. Zur Sättigung von unspezifischen Antikörperbindungsstellen erfolgte nun das Blocken mit jeweils 25 µl BSA-NGS (Bovine serum albumine-Normal goat serum: 0,1-prozentiges Rinderserumalbumin mit 10-prozentigem Ziegen Serum in PBS) bei Raumtemperatur. Nach einer Stunde wurde das BSA-NGS vorsichtig abgesaugt und es wurden 25 µl der Primärantikörper aufgebracht sowie über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Die jeweilige Verdünnung ist der Antikörpertabelle in Unterkapitel 2.3.2 zu entnehmen. Am Folgetag wurden die nicht gebundenen Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetragen. Nach erfolgter Inkubation wurden die überschüssigen Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Danach wurden die Objektträger einmal kurz in destilliertes Wasser getaucht und anschließend auf einem Labortuch vorsichtig abgetupft. Als nächster Schritt wurde auf den Objektträger ein Tropfen (25 µl) Vector Shield Mounting Medium mit DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) aufgebracht und die Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten zeigend blasenfrei aufgelegt. Analog hierzu wurden die Transwell-Filter mit der Zellseite nach oben auf den Objektträger aufgelegt und nach Aufbringen von Vectorshield mit einem Deckglas bedeckt. Vectorshield vermindert ein Ausbleichen der Fluoreszenz (Florijn et al., 1995), während das zugefügte DAPI die Zellkerne blau anfärbt. Die Immunfluoreszenzen wurden mit einem Confokal-Mikroskop (Leica) oder einem Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 (BIOREVO; Keyence, Osaka, Japan) fotografiert. Die Bearbeitung der Bilder beschränkte sich auf die Balance von Helligkeit und Kontrast und erfolgte mit Adobe Photoshop CS2.



### **2.5.7 Transfektion von Zellen mit siRNA für einen Protein-Knockdown**

Small interfering RNA (siRNA) sind kurze, einzel- oder doppelsträngige Ribonukleinsäure-Moleküle. Sie codieren nicht für Proteine, sondern interferieren mit komplementären einzelsträngigen Ribonukleinsäuren, wodurch deren Funktion inhibiert oder herabgesetzt wird. Ihre Rolle in der posttranskriptionellen Ausschaltung von Genen wurde Ende der Neunzigerjahre von den Pflanzenforschern Hamilton und Baulcombe beschrieben (Hamilton and Baulcombe 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde siRNA benutzt, um die Expression des RET-Rezeptors in Caco-2-Zellen herunterzuregulieren. Die verwendete siRNA wurde von Thermo Fisher Scientific (s11936) und Santa Cruz Biotechnology [Non Target (NT)-siRNA, sc-37007] bezogen. Die NT-siRNA diente als interne Kontrolle, um transfektionsbezogene Veränderungen an den Zellen ausschließen bzw. kontrollieren zu können. Prinzipiell gliedert sich der Vorgang der Transfektion in drei Teilabschnitte.

#### **Aussaat/Kultivierung:**

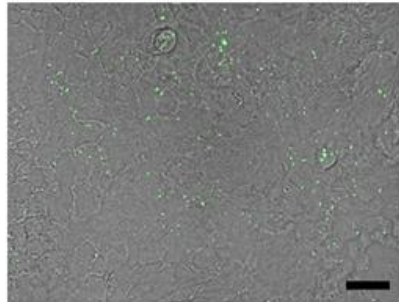
Zuerst erfolgte die Aussaat der Zellen. Hierfür wurden Caco-2-Zellen in 6-Well-Platten (Zellzahl =  $10^6$ ), Transwell-Filtern ( $10^6$ ), Deckgläschen ( $10^6$ ) oder ECIS-Elektroden ( $10^5$ ) ausgebracht. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Inkubation in DMEM mit FCS und P/S, an deren Ende der Zell-Monolayer zu circa 70 % konfluent gewachsen war.

#### **Transfektion:** (Angaben beziehen sich auf die Transfektion von 6-Well-Platten)

Nach Ablauf der 24-stündigen Wachstumsphase erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden für zwei Stunden mit 2 ml pro Well antibiotikafreiem DMEM inklusive FCS inkubiert. Danach wurden die Transfektionsreagenzien angesetzt. 150  $\mu$ l Opti-MEM®-Medium (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) wurden mit 9  $\mu$ l Lipofectamine®RNAiMax-Reagenz (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) je Well durch mehrmaliges vorsichtiges Pipettieren vermischt. Ein zweiter Ansatz bestand aus 150  $\mu$ l Opti-MEM®-Medium und 3  $\mu$ l siRNA (10  $\mu$ M) je Well. Beide Ansätze wurden anschließend durch vorsichtiges Pipettieren ineinander überführt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich stabile Komplexe aus der siRNA und dem Transfektionsreagenz bilden konnten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 250  $\mu$ l des gemischten Ansatzes pro Well zum vorgelegten antibiotikafreien DMEM hinzugegeben und die Zell-Platten mehrere Male vorsichtig geschwenkt.

### **Kontrolle der Transfektion:**

Nach 48 Stunden erfolgten die Ernte der Zell-Lysate und die Kontrolle des Transfektionserfolges mithilfe der Western-Blot-Methode. Zusätzlich wurde eine optische Kontrolle mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (BZ-9000, BIOREVO; Keyence, Osaka, Japan) und mit grün fluoreszierendem Protein (GFP; engl. green fluorescent protein) markierter NT-siRNA vorgenommen.



**Abbildung 8: NT-siRNA mit GFP-Tag**

Die Abbildung zeigt ein Overlay-Bild mit 20-facher Vergrößerung von Caco-2-Zellen 48 Stunden nach Transfektion mit einer Non-Target-siRNA. Die siRNA verfügt über eine GFP-Markierung, die unter dem Fluoreszenzmikroskop grün leuchtet. Das Zellmedium wurde kurz vor der Bildaufnahme gewechselt. Die Aufnahme diente als Qualitätskontrolle, um zu testen, ob das Transfektionssetting funktioniert (Maßstabsbalken = 100 µm).

*Quelle: Eigene Darstellung*

### **2.5.8 Knockdown von GDNF in der CRL2690-Zelllinie mithilfe der CRISPR/Cas-9-Methode**

Die in dieser Arbeit verwendeten EGC wurden mithilfe der CRISPR/Cas-Methode dahingehend manipuliert, dass sie weniger GDNF exprimierten. Ein vollständiger Knockout konnte indes nicht erreicht werden. Die Herstellung der GDNF-defizienten Zelllinie erfolgte durch die Arbeitsgruppe Diefenbacher am Biozentrum der Universität Würzburg. Sie wird hier der Vollständigkeit halber beschrieben.

Die durch die Arbeitsgruppe von Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna in Prokaryonten beschriebene und etablierte Methode (Jinek et al. 2012; Doudna and Charpentier 2014) wurde durch die Arbeitsgruppe um Feng Zhang entschieden verbessert, wobei erstmals eine Anwendung in Eukaryonten gezeigt werden konnte (Cong et al. 2013).

Bei der erwähnten Methode handelt es sich um eine Genschere, mit deren Hilfe an einer beliebigen Stelle im Genom einer Zelle ein Doppelstrangbruch der DNA induziert werden kann. Hierdurch wird eine Genomeditierung ermöglicht.

CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Sequenzen sind nicht codierende Stellen im Genom von Prokaryonten, die im Verbund mit der RNA-geführten DNA-Endonuklease Caspase9 genutzt werden, um eine Immunität gegenüber Viren und eindringenden Plasmiden zu erzeugen. Durch eine Änderung der RNA-Leitsequenz (engl. single guide RNA) kann die Schnittstelle im Genom neu programmiert werden und es können beispielsweise durch virale Vektoren neue DNA-Sequenzen eingefügt werden. Die Position der Mutation wird hierbei lediglich durch sog. PAM(Protospacer Adjacent Motif)-Sequenzen limitiert (Sander and Joung 2014).

Die AG Diefenbacher verwendete für das Design der sgRNA das Onlinetool chopchop (Labun et al. 2016). Für die Herstellung der sgRNA wurden vier Oligonukleotide mit den Zielpunkten Exon 3 und 5 auf der Gensequenz für murines GDNF verwendet:

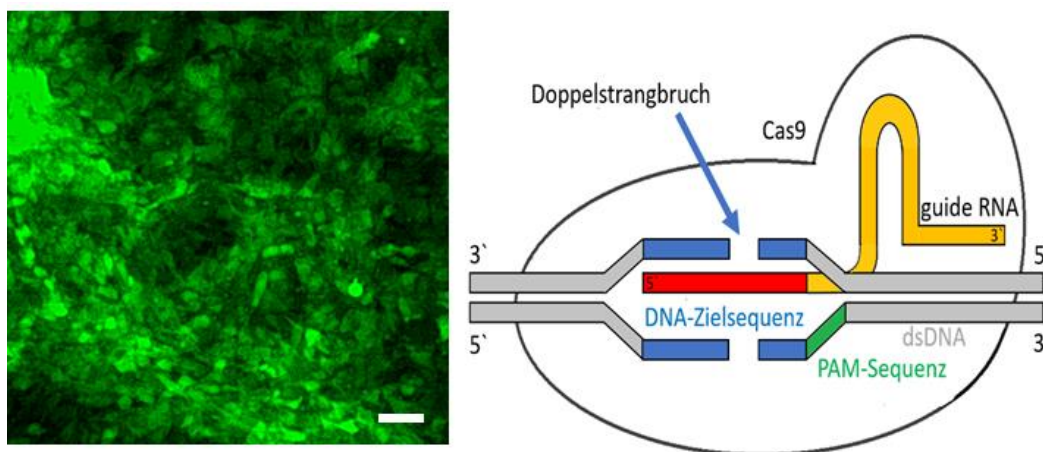
**Tabelle 4: Oligonukleotide CRISPER/Cas**

<b>Primer:</b>	<b>Sequenz:</b>
rat-ccGDNF 1f	CACCGTTCGAGAAGCGTCTTACCGG
rat-ccGDNF 1r	AAACCCGGTAAGACGCTTCTCGAAC
rat-ccGDNF 2f	CACCGTCACCAGATAAACAAGCGG
rat-ccGDNF 2r	AAACCCGCTTGTTTATCTGGTGAC

Für das Einbringen in die Zellen erfolgte anschließend die Klonierung der sgRNA in zwei virale Vektoren. Die sgRNA mit dem Zielpunkt Exon 3 wurde in pLentiCRISPR v2 kloniert (Geschenk von Feng Zhang, Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge Center Cambridge, MA, USA). Die Klonierung von sgRNA mit dem Zielpunkt Exon 5 erfolgte in pLKO5.sgRNA.EFS.GFP (Geschenk von Benjamin Ebert, Division of Hematology, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA). Lentivirale Partikel wurden von HEK293T-Zellen mithilfe eines lentivi-

ralen Verpackungssystems der zweiten Generation, das pPAX und pMD2-Packungsplasmide umfasst, produziert. Die murinen EGC wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und 24 Stunden später in Gegenwart von Polybren infiziert. Der virale Überstand beinhaltete die viralen Partikel LKO-sgRNA-EFS GFP sowie CrisprV2. Drei Tage nach der Infektion wurden die Zellen für eine Woche mit Puromycin (15 µg/ml) selektioniert. Dies wurde dadurch ermöglicht, dass der virale Vektor pLKO5.sgRNA.EFS.GFP neben einer GFP-Markierung auch ein Resistenzgen für Puromycin besitzt. Ein Mediumwechsel mit DMEM erfolgte alle zwei Tage. Puromycin-resistente Klone wurden anhand der GFP-Expression mit einem Fluss-Sortierer [engl. fluorescence-activated cell sorting (FACS)] identifiziert und sortiert. Daraufhin wurden einzelne GFP-positive Klone auf 24-Well-Platten ausgesät. Der Verlust von GDNF wurde anschließend durch quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) und Western-Blot-Analysen verifiziert.

Die Kultivierung der GDNF-Zelllinie erfolgte wie unter Punkt 1 beschrieben. Zusätzlich wurden die Zellen einmal wöchentlich für 24 Stunden mit Puromycin behandelt. Dieser Schritt war notwendig, da die Zellen nach einiger Zeit ihre GFP-positiven und GDNF-defizienten Eigenschaften verloren. Nach der wöchentlichen Replattierung erfolgte außerdem eine Kontrolle der GFP-Expression mit dem Fluoreszenzmikroskop. Durch die genannten Maßnahmen konnte die Transfektionsrate über den Zeitraum der Experimente bei 80 bis 90 % gehalten werden.



**Abbildung 9: EGC mit GFP-Tag und schematische Darstellung CRISPR/Cas**

Die Abbildung zeigt links GFP-positive (grün) EGC in 20-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Maßstabsbalken = 100 µm). Rechts im Bild ist eine schematische Darstellung der CRISPR/Cas-Methode zu sehen.

*Quelle: Eigene Darstellung*

### **2.5.9 Immunpräzipitation von GDNF aus Zellüberstand zur Depletion von GDNF**

Die Immunpräzipitation beschreibt ein Verfahren, bei dem mithilfe eines Antikörpers ein Antigen aus einer Lösung isoliert werden kann (Kaboord and Perr 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet, um von EGC sezerniertes GDNF aus Zellüberstand zu isolieren. Dazu wurde der GDNF-Antikörper auf Sepharose-Kugeln – sogenannten Beads – beschichtet, um damit die Konzentration von GDNF im Zellkulturüberstand zu verringern. Der GDNF-reduzierte Zellüberstand diente in der Folge als Basis für Permeabilitätsexperimente und das Anfertigen von Immunfluoreszenzen.

Als erster Schritt erfolgte die Aussaat von enterischen Gliazellen in T75-Well-Platten mit einer Zellzahl von  $10 \times 10^6$ . Die Zellen wurden für sechs Tage mit DMEM (20 ml) inkubiert, wobei das Zellmedium alle zwei Tage ausgetauscht wurde. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte eine Inkubation der Zellen mit FCS-freiem DMEM (15 ml) für 24 Stunden. Anschließend wurde der Zellüberstand in 15-ml-Falcon™-Röhrchen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) geerntet und die Zellen verworfen. Um etwaige Zellreste zu entfernen, wurde der Überstand bei 400 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Unter Belassung des Zellpellets wurde danach der Zellüberstand in 15 ml-Amicon®-Filterröhrchen 10K (Merck Millipore, Burlington, USA) um pipettiert. Mithilfe der Filter konnte der Zellüberstand aufkonzentriert werden, da alle Proteine, die kleiner als 10 kDa waren, herauszentrifugiert wurden. GDNF verblieb aufgrund seiner Molekülgröße von 15 kDa im Konzentrat. Die Aufreinigung erfolgte in einer vorgekühlten Zentrifuge (8 °C) bei 4000 g für 30 Minuten. Als Resultat blieben 700–1000 µl aufgereinigter Überstand übrig.

Jetzt erst erfolgte die eigentliche Immunpräzipitation, die sich in die folgenden Schritte gliederte und für die das Immunoprecipitation Starter Pack (GE Healthcare, Chicago, USA) verwendet wurde. Die Behandlung des Kontrollzellüberstandes erfolgte analog, wobei auf die unter dem Punkt ‚Antigen-Antikörper-Kopplung‘ beschriebene Zugabe von GDNF-Antikörper verzichtet wurde.

#### **Vorbereitung Medium:**

Bevor die nProtein-A-Sepharose- und nProtein-G-Sepharose-Beads verwendet wurden, erfolgte eine dreimalige Waschung mit Lysepuffer (RIPA-Puffer: 150 mM NaCl, 1 % IGEPAL CA-360, 0,5 % sodium deoxycholate (DOC) 0,1 % SDS, 50 mM Tris, ad 500

ml Aqua Dest, pH 8,0). Hierzu wurde jeweils 1 ml der verwendeten Beads mit 1 ml Lysepuffer vermischt und anschließend bei 12.000 g für 20 Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurde der Lysepuffer wieder abpipettiert und verworfen. Die gewaschenen Sepharose-Beads konnten dann bei 4 °C gelagert werden.

#### **Preclearing:**

Der nächste Schritt beinhaltete die sog. Vorklärun (engl. Preclearing). Er war notwendig, da im zu analysierenden Zellüberstand unspezifische Antikörper vorhanden sein können, die das Potential haben, die nachfolgenden Analysen zu stören. Um dies zu vermeiden, wurden zu 700–1000 µl aufgereinigtem Zellüberstand in 1,5-ml-Eppendorf-Gefäßen jeweils 25 µl nProtein-A-Sepharose- und nProtein-G-Sepharose-Beads zugegeben. Die erhaltene Lösung wurde anschließend auf einem Rotationsgerät (Model MXICI Dynal Sample Mixer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) für 60 Minuten bei 4 °C sanft gemischt. Anschließend erfolgten das Abzentrifugieren der Sepharose-Beads bei 12.000 g für 20 Sekunden sowie die Rückgewinnung des Zellüberstandes durch vorsichtiges Pipettieren in neue 1,5-ml-Eppendorf-Gefäße.

#### **Antigen-Antikörper-Kopplung:**

Nachfolgend wurde der Zellüberstand mit 15 µl GDNF-Antikörper versetzt und für weitere 60 Minuten auf dem Rotationsgerät bei 4 °C belassen.

#### **Präzipitation der Immunkomplexe:**

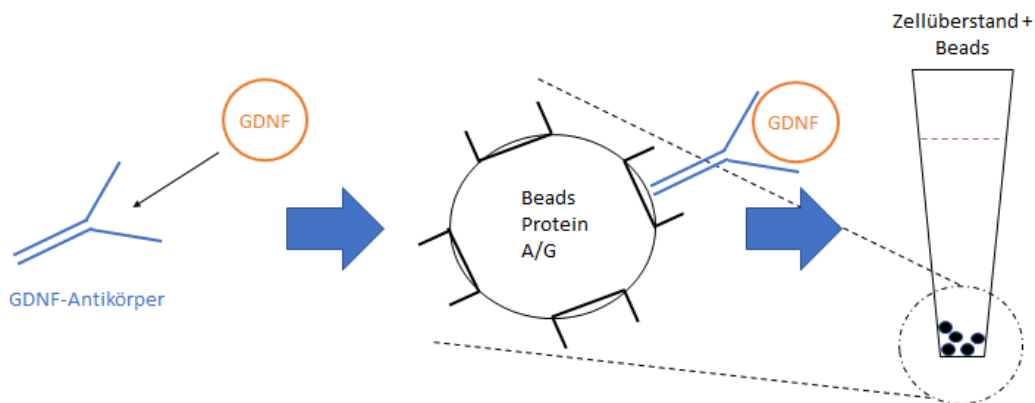
Damit die GDNF-Antikörper mitsamt des gebundenen GDNF an die Sepharose-Beads binden konnten, wurde der Zellüberstand mit jeweils 25 µl nProtein-A-Sepharose- und nProtein-G-Sepharose-Beads versetzt. Daran schlossen sich weitere 60 Minuten auf dem Rotationsgerät bei 4 °C an.

#### **Rückgewinnung des GDNF-freien Zellüberstandes:**

Die Lösung mit den an Sepharose-Beads gebundenen GDNF-Antikörpern und GDNF wurde anschließend für eine Minute bei 12.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Zellüberstand vom entstandenen Pellet abpipettiert. Hierbei war ein Sicherheitsabstand einzuhalten, um keine Sepharose-Beads in den Zellüberstand zu verschleppen. Der so entstandene GDNF-freie Zellüberstand konnte nun für Versuche verwendet werden. Der GDNF-Entzug wurde anschließend mittels Western Blot und ELISA verifiziert.

### Vorbereitung der Sepharose-Beads für Western Blot:

Das übriggebliebene Pellet mit den Sepharose-Beads wurde in 1 ml Lysepuffer (RIPA) mit der unter Punkt ‚Vorbereitung Medium‘ aufgezeigten Methode dreimalig gewaschen. Ergänzend erfolgte ein weiter Waschschrift mit 1 ml Waschpuffer (50 mM Tris, pH 8,0). Anschließend wurden die Sepharose-Beads in 50 µl Zelllysepuffer (25 mmol/L HEPES-Puffer (pH 7,6), 2 mmol/L EDTA, 25 mmol/L einprozentiges Sodium dodecyl sulfate (SDS)) und Halt™-Protease-Inhibitor-Cocktail im Verhältnis 1:100 (Thermofisher Scientific, Waltham, USA) überführt und für drei Minuten bei 95 °C erhitzt. Danach erfolgte das Abzentrifugieren der Beads bei 12.000 g für 20 Sekunden. Nachfolgend wurde der Überstand vorsichtig von den Beads mit der Pipette getrennt. Das verbleibende Beadspellet wurde verworfen und der erhaltene Überstand mit dem enthaltenen GDNF sonifiziert sowie mit dem Vortexgerät (SI-0236 Scientific Industries, New York, USA) bearbeitet. Die weitere Verarbeitung erfolgte analog zu den unter 2.5.3 beschriebenen Punkten.



**Abbildung 10: Schema Immunpräzipitation**

Die Abbildung zeigt stark vereinfacht den beschriebenen Versuchsablauf auf. Die GDNF-Antikörper binden das im Gliazellüberstand vorhandene GDNF. Anschließend wird der GDNF-Antikörper durch die Protein-A/G-Beads präzipitiert. Durch Zentrifugieren erfolgt die Auftrennung des Zellüberstandes und der Sepharose-Beads.

*Quelle: Eigene Darstellung*

### 2.5.10 Zellviabilitäts-Assay

Ein Zellviabilitäts-Assay bestimmt die Anzahl von vitalen Zellen. Hierfür existieren mehrere etablierte Verfahren. In dieser Arbeit fiel die Wahl auf den CellTiter-Glo® 2.0 Assay (Promega, Fitchburg, USA). Dieser quantifiziert die Anzahl vitaler Zellen anhand der ATP-Präsenz, woraus ein Rückschluss auf eine intakte Atmungskette und damit metabolisch aktive Zellen zulässig ist. Die ATP-Präsenz wird hierbei anhand einer enzymatischen Reaktion eines lumineszenten Farbstoffes mit dem Photometer quantifiziert. Der ATP-Assay birgt einige Vorteile. Beispielsweise lässt er im Vergleich zur Methode der Succinat-Dehydrogenase-Inhibition genauere Rückschlüsse auf die Zahl der lebenden Zellen zu (Maehara et al. 1987) und ist auch dem gerne verwendeten MTT(Tetrazolium-Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Assay in den Punkten Sensitivität und Reproduzierbarkeit überlegen (Petty et al. 1995).

Die Durchführung des Assays gliederte sich in zwei Schritte:

#### **Aussaat/Kultivierung:**

Die enterischen Gliazellen wurden auf lichtundurchlässigen 96-Well-Platten (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) ausgesät ( $10^4$ ) und bis zur Konfluenz kultiviert. Um den Zeitpunkt der Konfluenz mit dem Mikroskop bestimmen zu können, war es nötig, die Zellen zeitgleich auf einer lichtdurchlässigen 96-Well-Platte (Greiner Bio-One, CELLSTAR®), Kremsmünster, Österreich) zu kultivieren. Die Kultivierung folgte der bereits beschriebenen Routinekultur, wobei 200 µl Zellmedium je Well verwendet wurden. Die Konfluenz war nach zwei bis drei Tagen erreicht. Dann erfolgte die Inkubation mit Zytokinen für 24 Stunden mit den unter Punkt 2.2.1 beschriebenen Konzentrationen. Für die Inkubation mit den Entzündungsmediatoren wurde ausschließlich DMEM ohne FCS verwendet. Als Positiv-Kontrolle für Apoptose wurde Staurosporin in einer Konzentration von 1 µM verwendet.

#### **Durchführung Lumineszenz-Messung:**

Das Medium mit den Testreagenzien wurde vorsichtig abgesaugt und je Well durch 100 µl frisches DMEM ohne FCS-Zusatz ersetzt. Um ein Hintergrundsignal bei der späteren Lumineszenz-Messung herausfiltern zu können, wurden zusätzlich zwei Kontroll-Wells je Platte befüllt. Die Zellplatten wurden dann für 30 Minuten auf einem Orbitalschüttler



(Modell 3017, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel Deutschland) bei Raumtemperatur equilibriert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl CellTiter-Glo®-Reagenz, an die sich eine zweiminütige Phase auf dem Orbitalschüttler anschloss, um die Zell-Lyse zu induzieren. Nach weiteren 10 Minuten Inkubationszeit wurde die Lumineszenz-Messung mit dem Spectrophotometer (Tecan GENios Microplate Reader, MTX Lab systems, Bradenton, USA) durchgeführt.

### 2.5.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Entdeckung des PCR-Verfahrens wird Kary Mullis zugeschrieben (Mullis et al. 1986). Hierbei handelt es sich um eine Methode, um spezifische DNA-Sequenzen eines Gens zu vervielfältigen. Die namensgebende Kettenreaktion bezieht sich hierbei auf eine exponentielle DNA-Vervielfältigung, da Produkte vorheriger Zyklen als die Ausgangsprodukte nachfolgender Zyklen dienen. Ein PCR-Zyklus teilt sich schematisch betrachtet in drei Teile:

**Denaturierung:** Durch das Erhitzen auf circa 95 °C und das hieraus resultierende Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen werden die komplementären DNA-Stränge in Einzelstränge aufgetrennt.

**Primer-Anlagerung:** Die für die jeweilige DNA-Sequenz spezifischen Startsequenzen (engl. Primer) lagern sich bei einer für jeden Primer charakteristischen Temperatur an die DNA-Einzelstränge an. Hierfür wird jeweils ein Vorwärts- (engl. forward) bzw. ein Rückwärts-Primer (engl. reverse) benötigt. Die nötige Temperatur für diesen Prozess wird durch die Länge der Primer-Sequenzen bestimmt und bewegt sich zwischen 55 und 65 °C.

**Elongation:** Das Enzym DNA-Polymerase beginnt nun damit, die spezifischen DNA-Stränge zu verlängern und mit Oligonukleotiden aufzufüllen. Die Elongation beginnt stets am 3'-Ende der Primer. Der Prozess läuft außerdem bei einer für die DNA-Polymerase spezifischen Temperatur ab (68–72 °C).

Dadurch ergeben sich für eine PCR die folgenden benötigten Reagenzien: Primer (forward and reverse), Oligonukleotide, thermostabile DNA-Polymerase, DNA-Lösung und eine Polymerase-Pufferlösung. Die Schritte eines Zyklus werden repetitiv wiederholt.

Durch die Verwendung der Produkte als Matrix für neue Replikationen führt dies zu einer exponentiellen Vervielfältigung der gewünschten Gen-Sequenz. Von Bedeutung ist hier die Anmerkung, dass die Produkte der Verlängerung der Original-DNA zu lang sind, da sie zwar über einen Startpunkt (Primer), aber keinen Endpunkt verfügen. Die im weiteren Verlauf entstehenden Produkte besitzen jedoch die richtige Sequenz-Länge, da sie aufgrund der Arbeitsrichtung der DNA-Polymerase in 5' → 3'-Richtung über einen Endpunkt verfügen. Die Produkte mit der richtigen Sequenz-Länge vervielfältigen sich im weiteren Verlauf exponentiell, wohingegen die Produkte mit Überlänge nur die Original-DNA als Matrix aufweisen und so nur eine lineare Vermehrung erfahren. Dadurch ist bereits nach einigen PCR-Zyklen der quantitative Gehalt der überlangen DNA vernachlässigbar.

Das eben ausgeführte Prinzip ermöglicht zwar die Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz, jedoch lässt es keine Rückschlüsse auf die relative oder absolute Menge der für ein spezifisches Genprodukt kodierenden RNA-Sequenz in der Ausgangsprobe zu. Zu diesem Zweck muss die gewonnene RNA aus der Ausgangsprobe erst in cDNA umgewandelt werden. Dies geschieht mithilfe des Enzyms Reverse-Transkriptase, das einen zur gewonnenen RNA komplementären DNA-Strang synthetisiert. Diese cDNA kann dann für die Vervielfältigung mithilfe der PCR verwendet werden. Um nun auch noch eine quantitative Aussage über die in der Ausgangsprobe vorhandene RNA treffen zu können, wird eine Erweiterung der herkömmlichen PCR-Methode benötigt, nämlich die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR). Neben den oben aufgeführten Reagenzien wird hierbei zunächst ein inaktiver Fluoreszenzfarbstoff, wie bspw. SYBR-Green, hinzugefügt. Dieser Farbstoff wird durch eine Interkalation mit der DNA aktiviert und emittiert in der Folge Licht mit einer Wellenlänge im grünen Bereich. Diese Fluoreszenz wird nun im Verlauf bei jedem Zyklus photometrisch erfasst. Durch diese Messung lassen sich Rückschlüsse auf die Menge der insgesamt amplifizierte DNA-Menge ziehen. Diese Menge kann nun in das Verhältnis mit der Menge des gleichen DNA-Abschnittes bei gleicher Anzahl von Zyklen in einer Kontrollprobe gesetzt werden.

Die PCR-Analyse wurde in dieser Arbeit ausschließlich für die Analyse von Zell-Lysaten verwendet. Für die Extraktion der RNA aus den Zell-Lysaten wurde TRIzol (ThermoFis-

her Scientific, Waltham, USA) benutzt. Das iScript™ -cDNA Synthesekit (Biorad, München, Deutschland) wurde für die Herstellung der benötigten cDNA verwendet. Folgende Primer fanden für die qPCR Verwendung:

**Tabelle 5: Primer qPCR**

<b>Primer:</b>	<b>Sequenz:</b>
rat-GDNF forward	AAGAGAGAGGAACCGGCAAG
rat-GDNF reverse	CGACCTTCCCTCTGGAAT

Die qPCR wurde mittels MESA GREEN qPCR MasterMix Plus [Reaktionspuffer: (Glycerol < 10 %, Dimethylsulfoxide < 20 %), Desoxyribonukleosidtriphosphate mit Desoxyuridintriphosphat, Meteor Tag DNA-Polymerase, MgCl<sub>2</sub> (4 mM finale Konzentration), SYBR® Green I] für SYBR® Assay No ROX (beides Eurogentec, Köln, Deutschland) durchgeführt. Die Gen-Expression wurde anschließend mithilfe der Biorad CFX Manager Software mit β 2-Mikroglobulin (B2M) als Referenz-Gen analysiert. Alle Reaktionen fanden als Duplikat statt. Die Hybridisierungstemperatur betrug 64,5 °C. Die Primer wurden in einer Konzentration von 5 μM hinzugefügt.

## 2.6 Angaben zur Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Software Prism (GraphPad, La Jolla, USA). Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben (SEM). Als statistisch signifikant wurden Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % ( $p < 0.05$ ) erachtet und in den graphischen Darstellungen mit \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  oder \*\*\*\* $p < 0.0001$  gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte durch Felix Kannapin und wurde wie folgt durchgeführt.

Ob eine Normalverteilung vorliegt, wurde abhängig von der Stichprobengröße mithilfe des D'Agostino-Pearson-Omnibus-Tests oder des Shapiro-Wilk-Normalitätstests überprüft.

Der Vergleich von zwei Gruppen mit normalverteilten Werten wurden mit dem Student's t-Test vorgenommen. Nicht parametrisch verteilte, unverbundene Werte wurden beim

Vergleich zweier Gruppen mithilfe des Mann-Whitney-Tests analysiert. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde für den Vergleich von zwei verbundenen Gruppen mit nicht parametrisch verteilten Werten verwendet.

Unterschiede zwischen mehreren Versuchsgruppen mit parametrisch verteilten Werten wurden mithilfe einer Varianzanalyse (ANOVA, analysis of the variance) und nachgeschalteter Bonferroni-Korrektur zur Elimination des  $\alpha$ -Fehlers verifiziert.

Waren die Werte innerhalb mehrerer Versuchsgruppen nicht parametrisch verteilt, wurde der Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Dunn's-Test verwendet.

Der Vergleich mehrerer Gruppen unter dem Einfluss von zwei Faktoren erfolgte durch Anwendung der zweifachen Varianzanalyse (Two-way Anova).

Die erhobenen Daten basieren auf mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten ( $N \geq 3$ ). Die genaue Bezeichnung der jeweiligen Stichprobengröße ist den Abbildungen im Ergebnisteil zu entnehmen.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Optimierung der Methodik und vorbereitende Untersuchungen**

Nachfolgend werden den zur Beantwortung der Fragestellung durchgeführten Experimenten einige vorbereitende Untersuchungen vorangestellt.

##### **3.1.1 Untersuchungen zur Optimierung der TEER-Messung an Caco-2-Zellen**

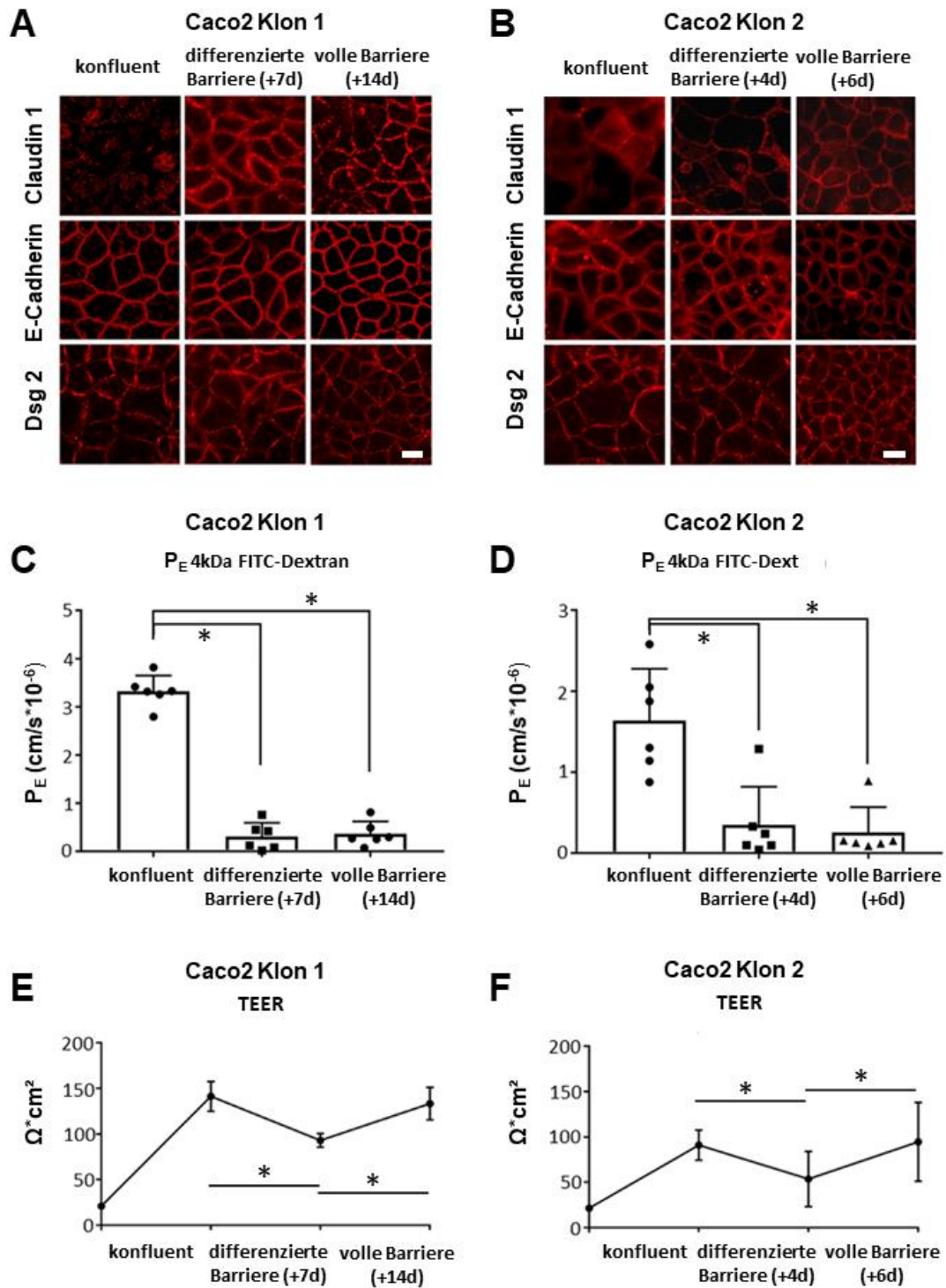
Zunächst wurde zur Beantwortung der Fragestellung eine methodische Optimierung der Messungen des TEER bei Caco-2-Zellen und eine Charakterisierung der Caco-2-Zellen als Modell für die Enterozytenbarriere vorgenommen. Es zeigte sich, dass bei Messungen des TEER der Caco-2-Zellen nach Erreichen der Konfluenz ein Abfall der Widerstände beobachtbar war. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurde der Differenzierungsprozess in zwei verschiedenen Caco-2-Zell-Klonen evaluiert. Initial wurden Immunfluoreszenzfärbungen von charakteristischen Junctionsproteinen durchgeführt. Anhand derer wurde ersichtlich, dass eine voll ausdifferenzierte Barriere bei Klon 1 (ATCC, Wesel) nach 14 Tagen und bei Klon 2 (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) nach sechs Tagen ab Erreichen des Konfluenzstadiums vorliegt. Erst nach dem genannten Zeitraum waren die untersuchten Junctionsproteine vollständig an den Zellgrenzen lokalisiert.

Anschließend erfolgten funktionelle Messungen der Enterozytenbarriere. Permeabilitätsmessungen mit 4 kDa FTIC-Dextran in Transwell-Filterkammern ergaben für Klon 1 eine signifikante Abnahme des Permeabilitätskoeffizienten nach sieben Tagen Differenzierungsprozess [ $P_E = 0,31 \pm 0,11$  (cm/s \*  $10^{-6}$ )] gegenüber dem Konfluenzstadium [ $P_E = 3,32 \pm 0,13$  (cm/s \*  $10^{-6}$ )]. Dies änderte sich auch nach 14 Tagen Differenzierungsprozess nicht signifikant [ $P_E = 0,36 \pm 0,10$  (cm/s \*  $10^{-6}$ )]. Die Ergebnisse ließen sich mit Klon 2 reproduzieren. Im Konfluenzstadium zeigte sich ein Permeabilitätskoeffizient von  $1,64 \pm 0,26$  (cm/s \*  $10^{-6}$ ). Dieser fiel nach vier Tagen signifikant ab [ $P_E = 0,35 \pm 0,19$  (cm/s \*  $10^{-6}$ )] und verharrte auch nach sechs Tagen auf diesem Niveau.

In den parallel durchgeführten TEER-Messungen fiel dagegen, nach kontinuierlicher Zunahme, ein maximaler gemessener transepithelialer Widerstand mit Erreichen der

Konfluenz auf. Dieser betrug bei Klon 1  $137 \pm 16 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Nach sieben Tagen wurde ein Abfall auf  $88 \pm 7 \Omega \cdot \text{cm}^2$  detektiert, der sich erst nach der vollständigen Ausdifferenzierung des Monolayers nach 14 Tagen wieder vollständig ausglich [TEER:  $139 \pm 18 (\Omega \cdot \text{cm}^2)$ ]. Ähnliche Beobachtungen waren bei Klon 2 anzustellen. Mit Erreichen der Konfluenz konnte ein TEER von  $87 \pm 2 \Omega \cdot \text{cm}^2$  detektiert werden, der nach vier Tagen signifikant abfiel, um erst bei einer vollständig differenzierten Barriere das Ausgangsniveau zu erreichen [TEER:  $91 \pm 1 (\Omega \cdot \text{cm}^2)$ ].

Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde, um reproduzierbare und vor allem vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, bei den nachfolgenden Ko-Kultur-Experimenten nur noch ein Caco-2-Klon (ATCC, Wesel) verwendet.



**Abbildung 11: Differenzierung von Caco-2-Zellen im zeitlichen Verlauf**

A/B: Dargestellt sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen während des Differenzierungsprozesses von Caco-2-Zellen (Stichprobengröße: N = 6, Maßstabsbalken = 20  $\mu\text{m}$ ).

C/D: Die Permeabilitätsmessungen mit 4kDa FITC-Dextran zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Differenzierungsprozesses zeigte eine kontinuierliche Abnahme des Permeabilitätskoeffizienten. Statistische Tests: One-way Anova und Shapiro-Wilk-Normalverteilungstest, \* $p < 0,05$  (Stichprobengröße: N = 6).

E/F: Die Messung des TEER während unterschiedlichen Zeitpunkten im Differenzierungsprozess ergab einen wellenförmigen Verlauf. Statistische Tests: Two-way Anova und D'Agostino-&-Pearson-Normalitätstest, \* $p < 0,05$  (Stichprobengröße:  $n = 10$ ).

*Quelle: Eigene Darstellung*

### **3.1.2 Etablierung des Ko-Kultur-Modells und GDNF-Expression in vivo**

Für alle folgenden Untersuchungen war die Etablierung eines Ko-Kultur-Modells zwischen Caco-2-Zellen und enterischen Gliazellen notwendig. Zusätzlich erfolgten der Nachweis von GDNF-Rezeptoren in den verwendeten Zelllinien und eine Überprüfung, ob EGC in vivo ausreichend zur GDNF-Produktion im Intestinum beitragen.

#### **3.1.2.1 Ko-Kultivierung von Caco-2-Zellen mit EGC**

Es existieren bereits mehrere Untersuchungen, in denen ein Einfluss von EGC auf Enterozyten und die Darmbarriere nachgewiesen wurde. Trotzdem musste zu Beginn der vorliegenden Dissertation das verwendete Ko-Kultur-Modell getestet werden. Dazu wurden Caco-2-Zellen auf Transwell-Filtern ausgebracht und bis zum Stadium C-1 kultiviert. Anschließend erfolgte ein Wechsel auf ein FCS-freies Medium und die subkonfluenten Zellen wurden für 24 Stunden mit EGC bis zum Erreichen der Konfluenz ko-kultiviert. Nachfolgend wurde als Maßstab für die intestinale Barrierefunktion ein Transwell-Assay durchgeführt, bei dem der Flux von FITC-Dextran über den Enterozyten-Monolayer gemessen wurde. Die Caco-2-Zellen in Ko-Kultur zeigten hierbei eine um 32 % reduzierte Permeabilität von FITC-Dextran [ $P_E = 0,99 \pm 0,15$  (cm/s \* $10^{-6}$ )] gegenüber den Kontrollzellen ohne Ko-Kultur [ $P_E = 1,32 \pm 0,15$  (cm/s \* $10^{-6}$ )].

Im Anschluss wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Transwell-Filter durchgeführt, um den Einfluss der EGC auf die Junctionsproteine der Enterozyten zu visualisieren. Hierbei wurden jeweils drei Proteine der unterschiedlichen Teile des Schlussleistenkomplexes angefärbt. Bei der Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop präsentierten die ko-kultivierten Caco-2-Zellen eine schnellere Differenzierung der Zell-Zell-Kontakte. Sehr deutlich zu sehen war dies bei dem desmosomalen Junctionsprotein Dsg 2, das in der Ko-Kultur im typischen Schiffsnetzen-ähnlichen Muster linear an den Zellgrenzen

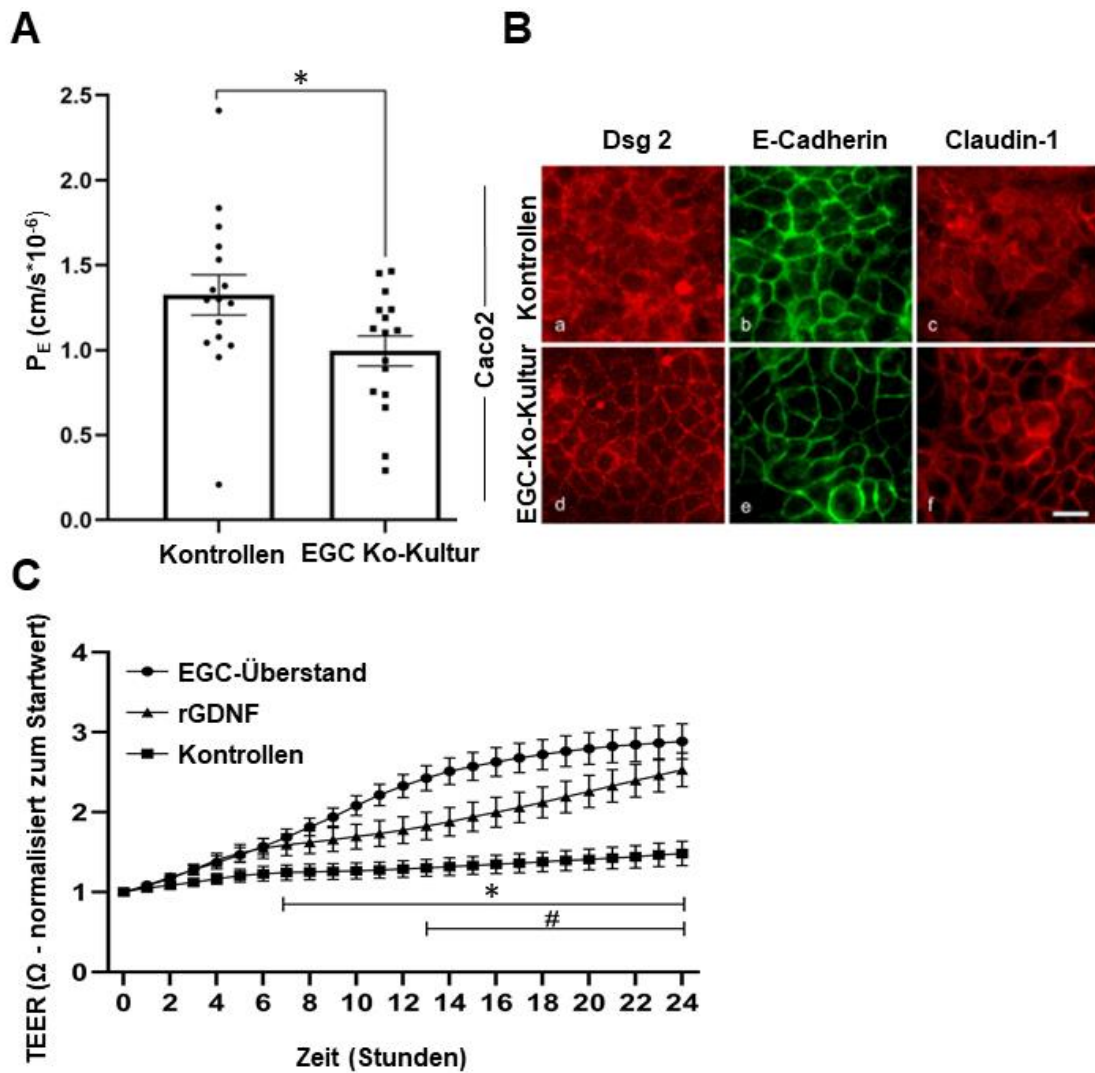


lokalisiert war. In der Kontrollgruppe zeigte sich dagegen ein diffuseres Expressionsmuster. Ähnlich präsentierte sich dies beim Tight-Junction-Protein Claudin 1, das unter Ko-Kultur-Bedingungen an den Zellgrenzen lokalisiert war, wohingegen in der Kontrollgruppe keine zellrandständige Färbung evident war. Ein weniger auffallender Unterschied war beim Adhärenskontakt E-Cadherin auszumachen, wemngleich auch dieses eine größere Linearisierung an den Zellgrenzen als in der Kontrollgruppe vermuten ließ.

Abschließend wurden Messungen des TEER durchgeführt, um die Veränderung der Enterozytenbarriere im Laufe der Zeit abbilden zu können. Es wurden rGDNF (100 ng/ml) und EGC-Zellüberstand auf subkonfluente Caco-2-Zellen appliziert. Danach startete die Messung. Der ermittelte Endpunkt (24 Stunden) des transepithelialen Widerstandes (TEER) war in der Kohorte mit EGC-Zellüberstand um den Faktor 1,9 [TEER:  $2,88 \pm 0,27$  ( $\Omega$ )] und in der Kohorte mit rGDNF um den Faktor 1,7 [TEER:  $2,53 \pm 0,26$  ( $\Omega$ )] gegenüber den Kontrollen [TEER:  $1,48 \pm 0,26$  ( $\Omega$ )] erhöht. Zwischen beiden Interventionsgruppen kam es zu keinem messbaren signifikanten Unterschied, jedoch verlief die Kurve des Widerstandanstiegs in der EGC-Gruppe steiler als in der rekombinanten GDNF-Gruppe und erreichte gegenüber den Kontrollen früher das Signifikanzniveau.

Diese Ergebnisse bestätigen die Funktionalität des verwendeten Ko-Kultur-Modells. Die in Ko-Kultur gereiften Caco-2-Zellen zeigten einen deutlich differenzierten Monolayer im Konfluenzstadium, was sich auch durch die niedrigere Permeabilität für 4-kDa FITC-Dextran im durchgeführten Transwell-Assay ausdrückt.

Die Messungen des TEER lassen erkennen, dass die Applikation von EGC-Überstand und rekombinatem GDNF zu einer ähnlichen Steigerung des transepithelialen Widerstandes und damit vergleichbar zur Ausreifung der Zell-Zell-Kontakte beiträgt.



**Abbildung 12: Veränderungen der Permeabilität und Lokalisation von Junctionsproteinen**

A: Die Abbildung stellt den durchgeführten Transwell-Assay mit und ohne EGC-Ko-Kultur dar. Statistische Tests: Student's t-Test und D'Agostino-&-Pearson-Normalitätstest,  $*p < 0,05$  (Stichprobengröße:  $N = 16$ ,  $n = 32$ ).

B: Die Abbildung zeigt eine deutliche Linearisierung der Zell-Zell-Kontakte an den Zellgrenzen in der EGC-Ko-Kultur (Maßstabsbalken = 20  $\mu\text{m}$ , Stichprobengröße  $N > 3$ ).

C: Eine Inkubation von subkonfluenten Caco-2-Zellen mit Gliazellüberstand oder rekombinantem GDNF führte bei Messungen des transepithelialen Widerstandes zu vergleichbaren Ergebnissen. Statistische Tests: Two-way Anova und D'Agostino-&-Pearson-Normalitätstest,  $*p < 0,05$  EGC Überstand signifikant gegenüber Kontrollen,  $\#p < 0,05$  rGDNF signifikant gegenüber Kontrollen (Stichprobengröße:  $N = 5$ ,  $n = 15$ ).

Quelle: Eigene Darstellung

### 3.1.2.2 Caco-2- und CRL2690-Zellen exprimieren GDNF-Rezeptoren.

Mithilfe einer Western-Blot-Analyse wurde überprüft, ob die in der Ko-Kultur verwendeten Zelltypen den RET-Rezeptorkomplex exprimieren. Die verwendeten Zellkulturen wurden hierzu zum Zeitpunkt der Konfluenz geerntet und zu Zell-Lysaten verarbeitet. Caco-2-Zellen exprimierten sowohl RET-, GFR $\alpha$ 1-, GFR $\alpha$ 2- als auch GFR $\alpha$ 3-Rezeptoren. Die verwendeten EGC exprimierten sowohl als Wildtyp (EGC <sup>+/+</sup>) als auch in der GDNF-defizienten Variante (EGC <sup>KD</sup>) alle der bereits genannten Rezeptoren mit Ausnahme des GFR $\alpha$ 1-Rezeptors. Als Ladungskontrolle wurde  $\beta$ -Actin verwendet.

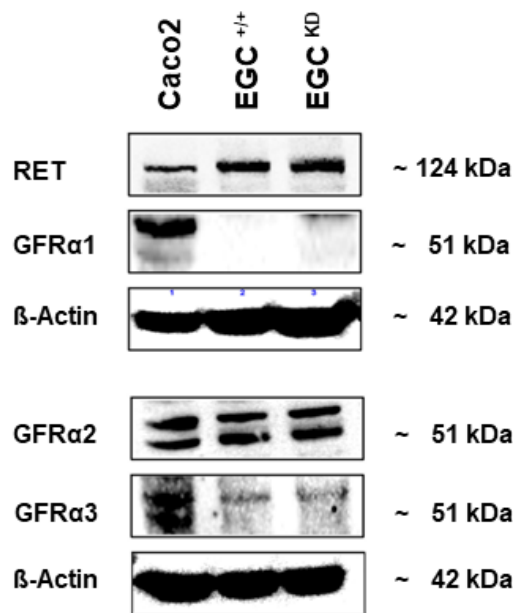


Abbildung 13: GDNF-Rezeptorexpression in den verwendeten Zelllinien

In Western-Blot-Untersuchungen wurde die Proteinexpression von RET, GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2 und GFR $\alpha$ 3 in den untersuchten Zelllinien verifiziert.  $\beta$ -Actin diente als Ladungskontrolle. N = 3.

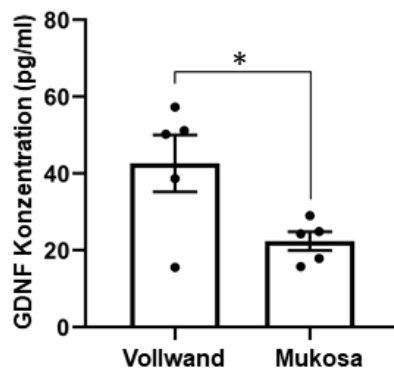
Quelle: Eigene Darstellung

### 3.1.2.3 Unterschiedliche Expression von GDNF in der humanen Mukosa und den übrigen Darmwandanteilen in vivo

Die GDNF-Expression von EGC steht im Mittelpunkt der vorliegenden Dissertation. Um annäherungsweise bestimmen zu können, welchen Beitrag EGC in vivo zur GDNF-Expression im Intestinum leisten, erfolgte eine getrennte Analyse der GDNF-Konzentration

in Darmwandproben aus Vollwand- und Mukosa-Gewebe. Bei den Proben handelte es sich um drei Proben aus dem Kolon und zwei Proben aus dem terminalen Ileum von Kontrollpatienten, von denen jeweils eine Vollwand- und eine Mukosa-Probe mit ELISA analysiert wurden.

Bei der Auswertung der fünf korrespondierenden Gewebeproben konnte eine um den Faktor 1,9 höhere GDNF-Konzentration in den Vollwandgewebeproben detektiert werden [GDNF: 42,61 vs.  $22,38 \pm 7,79$  (pg/ml)]. Mit Blick auf den schematischen Aufbau der Darmwand sind EGC hauptsächlich in den beiden Plexus lokalisiert, die vollständig nur in den transmuralen Gewebeproben enthalten waren. Unter diesem Gesichtspunkt stützt das Ergebnis die These, dass EGC einen großen Beitrag zur GDNF-Produktion in vivo leisten.



**Abbildung 14: GDNF-Expression in Vollwand- und Mukosa-Lysaten**

ELISA-Messung der GDNF-Konzentration in Vollwand- und Mukosa-Gewebeproben. Statistische Tests: Student's t-Test und Shapiro-Wilk-Normalverteilungstest, \* $p < 0,05$  (Stichprobengröße:  $n = 5$ ).

*Quelle: Eigene Darstellung*

### **3.2 Von EGC sezerniertes GDNF führt zu einer schnelleren Reifung der intestinalen Barriere in Enterozyten.**

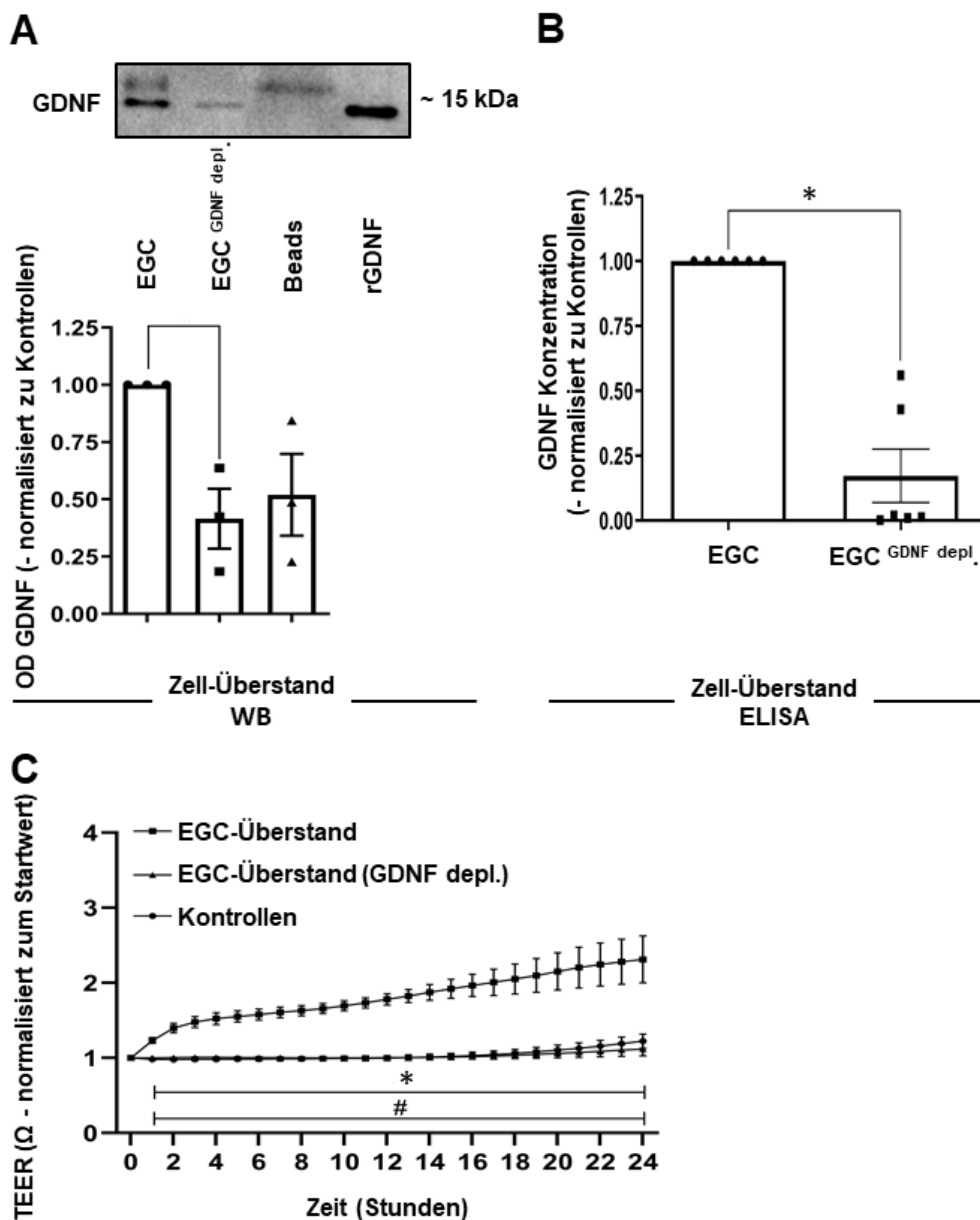
Um zu eruieren, ob von EGC sezerniertes GDNF für die schnellere Reifung des Enterozyten-Monolayers verantwortlich ist, oder es sich um einen unspezifischen Ko-Kultureffekt handelt, wurden verschiedene Versuchsreihen konzipiert. Diese basierten einerseits auf der Reduktion der GDNF-Konzentration im glialen Zellüberstand mittels Immunprä-

zipitation. Andererseits wurde eine Genomeditierung der verwendeten Gliazelllinie mittels CRISPR/Cas durchgeführt, wobei eine partielle Herunterregulation der GDNF-Expression erreicht wurde. Um die Veränderung der Barrierefunktion gegen die Zeit darstellen zu können, wurde erneut der TEER bestimmt. Die Darstellung der Zell-Zell-Kontakte erfolgte durch Immunfluoreszenzfärbungen.

### **3.2.1 Eine Reduktion von GDNF aus dem Zellkulturüberstand von EGC mittels Immunpräzipitation verhindert den Anstieg des TEER.**

Um das durch EGC in den Zellüberstand sezernierte GDNF zu entfernen, wurde das bereits im Material- und Methoden-Teil ausführlich beschriebene Verfahren der Immunpräzipitation angewandt. Durch diese auf Antikörperbindung basierende Methode wurde der GDNF-Gehalt im EGC-Überstand reduziert. In Western-Blot-Versuchen konnte eine Reduktion des GDNF-Gehaltes um 59 % (OD:  $0,41 \pm 0,18$ ) gegenüber dem Kontrollüberstand festgestellt werden. Als zusätzliche Kontrolle dienten die aufgetragenen Sepharose-Beads, die ein spezifisches Signal für GDNF zeigten, und rekombinantes GDNF. Ein nachfolgend durchgeführter ELISA-Assay bestätigte eine GDNF-Reduktion um 83 % [GDNF:  $0,17 \pm 0,10$  normalisiert zu Kontrollen].

Nachfolgend wurden bei Messungen des TEER subkonfluente Caco-2-Zellen sowohl mit GDNF-depletiertem Zellüberstand (EGC-Überstand GDNF<sup>depletiert</sup>), EGC-Kontrollüberstand (EGC-Überstand) als auch serumfreiem Zellmedium (Kontrollen) inkubiert. Der hierbei gemessene TEER zeigte im Zeitverlauf von 24 Stunden keinen messbaren signifikanten Unterschied, wenn serumfreies Medium oder GDNF-depletierter Überstand verwendet wurde [TEER: 1,34 vs.  $1,13 \pm 0,15$  ( $\Omega$ )]. Der applizierte EGC-Kontrollüberstand wies am Endpunkt der Messung (24 Stunden) jedoch einen um den Faktor 2,1 erhöhten TEER gegenüber Kontrollen [TEER: 2,87 vs.  $1,34 \pm 0,12$  ( $\Omega$ )] bzw. einen um den Faktor 2,6 erhöhten TEER im Vergleich zu den GDNF-depletierten Überständen [TEER: 2,87 vs.  $1,13 \pm 0,13$  ( $\Omega$ )] auf.



**Abbildung 15: GDNF-Immünpräzipitation aus Zellüberstand**

A: Die Western-Blot-Analyse zeigt die erfolgreiche Depletion von GDNF aus dem Zellüberstand von EGC. Statistische Tests: Wilcoxon-Signed-Ranked-Test und Shapiro-Wilk-Normalitätstest, \* $p < 0,05$  (Stichprobengröße  $N = 3$ ).

B: Die abgebildeten Daten des durchgeführten ELISA-Assays bestätigen den erfolgreichen GDNF-Entzug aus dem EGC-Überstand. Statistische Test: Wilcoxon-Signed-Ranked-Test und Shapiro-Wilk-Normalverteilungstest, \* $p < 0,05$  (Stichprobengröße  $n = 6$ ).

C: Die Messung des TEER zeigte keinen signifikanten Unterschied nach der Applikation von GDNF-depletiertem Überstand und Kontrollen. Die Zugabe von unbehandeltem EGC-Überstand beschleunigte die Reifung des Enterozyten-Monolayers. Statistische Tests: Two-way Anova und D'Agostino-&Pearson-Normalitätstest, \* $p < 0,05$  EGC-Überstand signifikant gegenüber Kontrollen und EGC-Überstand GDNF-depletiert (Stichprobengröße:  $N = 5$ ,  $n = 15$ ).

Quelle: Eigene Darstellung

### 3.2.2 Herstellung und Verwendung einer GDNF-knock-down-EGC-Zelllinie mithilfe von CRISPR/Cas

Die GDNF-defiziente Zelllinie wurde durch einen Kooperationspartner bereitgestellt. Dieser manipulierte die CRL2690-Zellen unter Verwendung der CRISPR/Cas9-Methode dahingehend, dass sie weniger GDNF exprimierten. Western-Blot-Analysen von Zelllysaten wiesen eine gegenüber Kontrollen um 50 % reduzierte optische Dichte (OD:  $49,68 \pm 0,06$ ) bezüglich der GDNF-Expression auf. Eine Untersuchung der in den Zelllysaten exprimierten RNA wies eine mit 42 % (OD: 1,94 vs.  $1,13 \pm 0,26$ ) vergleichbare Reduktion auf. Relevanter als die Reduktion auf zellulärer Ebene war im Hinblick auf die durchgeführten Experimente jedoch die Reduktion von GDNF im untersuchten Zellüberstand. Hierbei ergab sich in Western-Blot-Analysen ein um 72 % verringerter GDNF-Gehalt (OD: 1,00 vs.  $0,27 \pm 0,05$ ). Entsprechend wiesen ELISA-Untersuchungen eine Reduktion von 80 % auf [GDNF: 78,60 vs.  $15,97 \pm 5,76$  (pg/ml)].

Nach der Bestätigung des Erfolges der Genomeditierung schloss sich eine Wiederholung der bereits oben beschriebenen Bestimmung des TEER an. Der Zellüberstand aus unbehandelten enterischen Gliazellen (EGC<sup>+/+</sup>) wies nach 24 Stunden eine Erhöhung des TEER gegenüber Kontrollen um den Faktor 2,4 auf [TEER: 3,18 vs.  $1,32 \pm 0,20$  ( $\Omega$ )], wohingegen die GDNF-defiziente Zelllinie (EGC<sup>GDNF<sup>KD</sup></sup>) diesen lediglich um den Faktor 1,5 erhöhte [TEER: 1,93 vs.  $1,32 \pm 0,21$  ( $\Omega$ )]. Die Messwerte der TEER-Messung unterschieden sich ebenfalls signifikant zwischen den beiden verwendeten EGC-Überständen um den Faktor 1,6 [TEER: 3,18 vs.  $1,93 \pm 0,14$  ( $\Omega$ )].

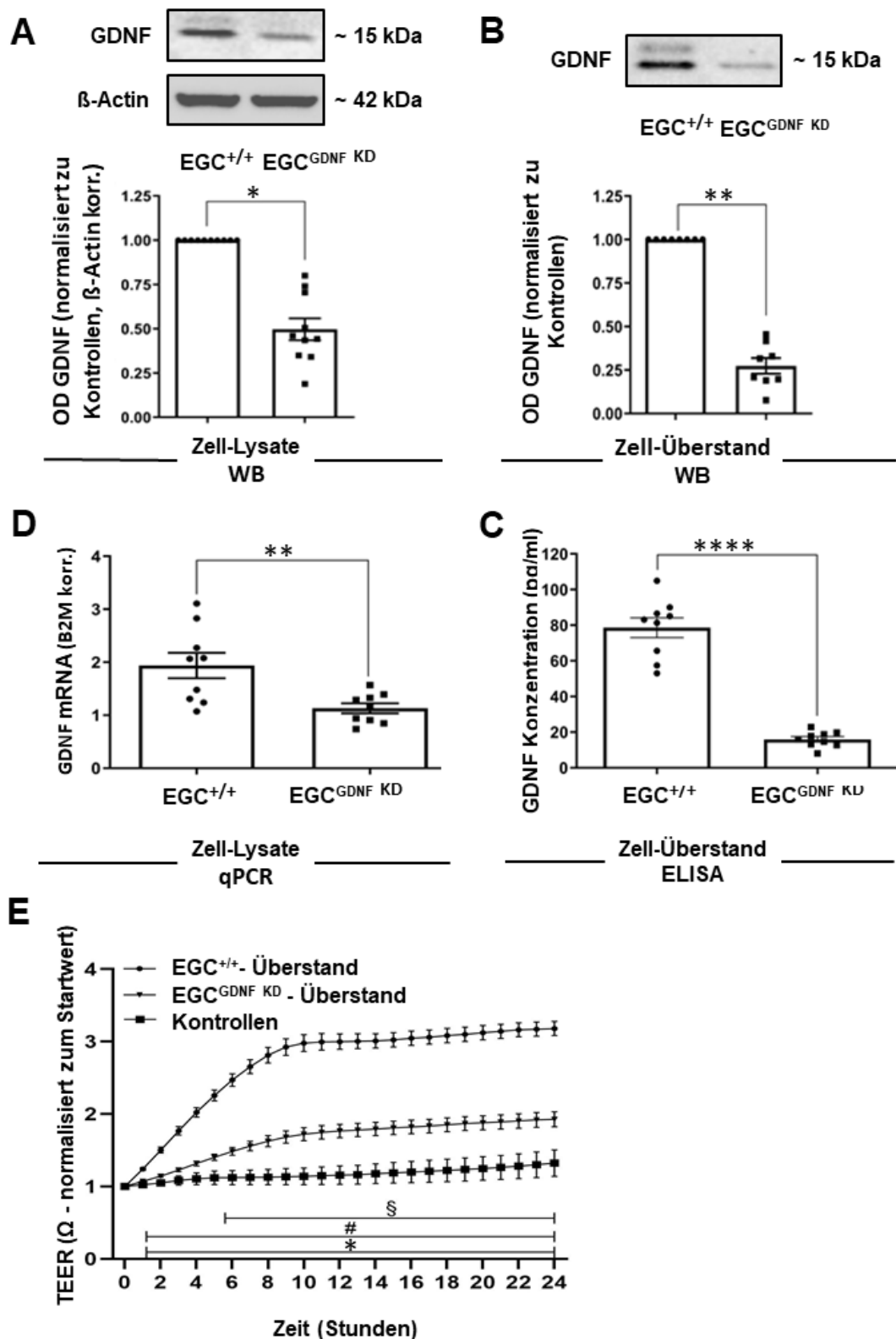


Abbildung 16: GDNF-Knockdown in EGC mithilfe von CRISPR-Cas

A: Die Abbildung zeigt die verminderte Expression von GDNF in EGC-Zell-Lysaten nach der Genomeditierung. Statistische Tests: Mann-Whitney-Test und D'Agostino-&-Pearson-Normalitätstest, \*\* $p < 0,01$  (Stichprobengröße:  $n = 10$ ).



B: Western-Blot-Untersuchungen zeigten auf, dass EGC<sup>GDNF<sup>KD</sup></sup> weniger GDNF in den Zellüberstand sezernieren als EGC<sup>+/+</sup>-Zellen. Statistische Tests: Mann-Whitney-Test und D'Agostino-&-Pearson-Normalitätstest, \*\*p < 0,01 (Stichprobengröße: n = 8).

C: qPCR-Messungen der GDNF-mRNA in Zell-Lysaten bestätigten die reduzierte GDNF-Expression auf translationaler Ebene. Statistische Tests: Mann-Whitney-Test und D'Agostino-&-Pearson-Normalitätstest, \*\*p < 0,01 (Stichprobengröße: n = 9).

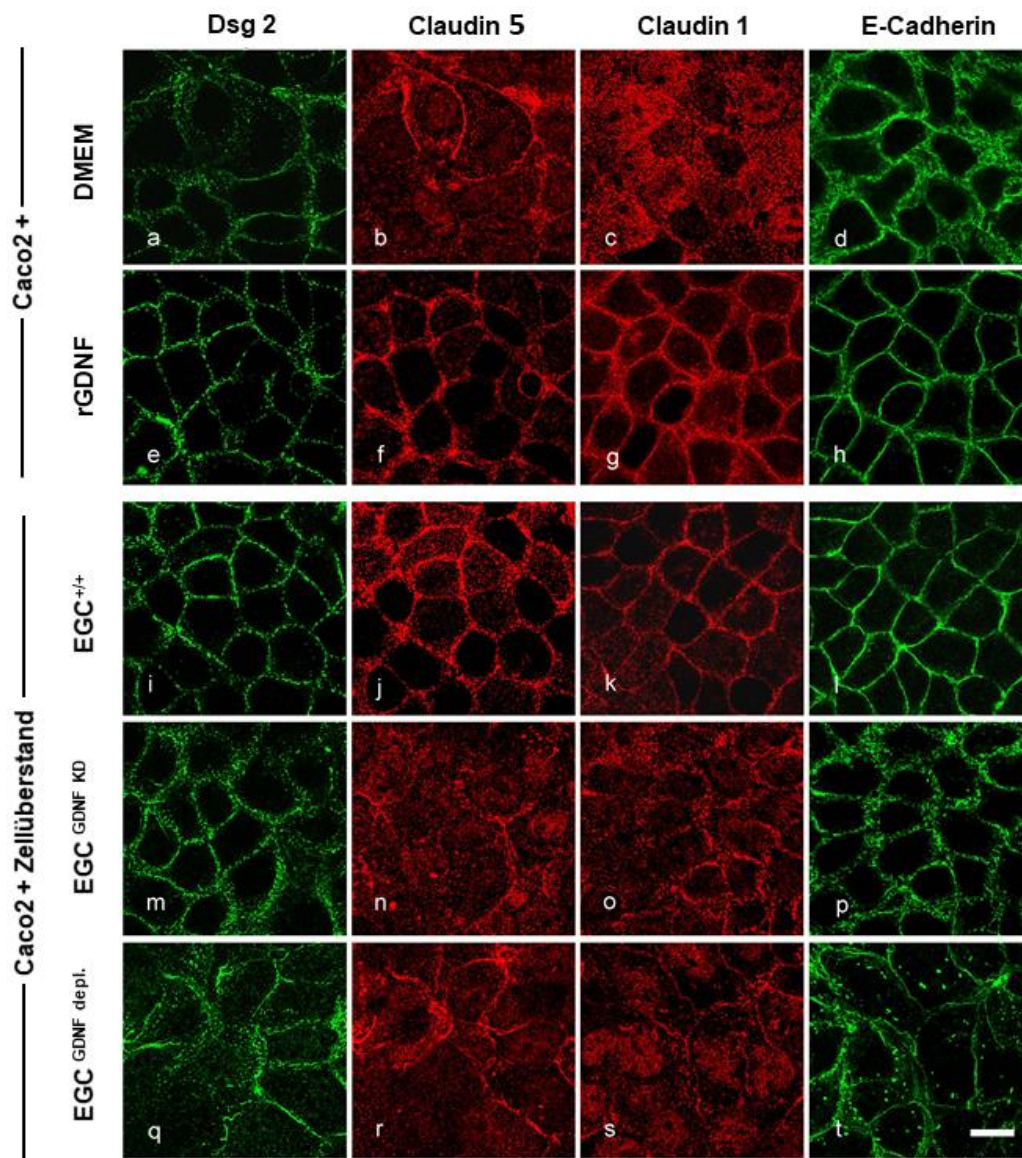
D: Ein durchgeführter ELISA-Assay bestätigte die verminderte GDNF-Sekretion in den Zellüberstand von EGC<sup>GDNF<sup>KD</sup></sup>. Statistische Tests: Student's t-Test und D'Agostino-&-Pearson-Normalitätstest, \*\*\*p < 0,0001 (Stichprobengröße: n = 9).

E: Der gezeigten TEER-Messung ist zu entnehmen, dass der Überstand von EGC<sup>GDNF<sup>KD</sup></sup> den über dem subkonfluenten Caco-2-Monolayer gemessenen TEER wesentlich schwächer erhöhte als EGC<sup>+/+</sup>-Überstand. Statistische Tests: Two-way Anova und D'Agostino-&-Pearson-Normalitätstest, \*p < 0,05 EGC<sup>+/+</sup> signifikant gegenüber Kontrollen, #p < 0,05 EGC<sup>+/+</sup> signifikant gegenüber EGC<sup>GDNF<sup>KD</sup></sup>, §p < 0,05 EGC<sup>GDNF<sup>KD</sup></sup> signifikant gegenüber Kontrollen (Stichprobengröße: N = 5, n = 15).

*Quelle: Eigene Darstellung*

Die dargelegten Versuche deuten auf die Relevanz des von EGC sezernierten GDNF für die Reifung der intestinalen Barriere von Enterozyten hin. Um dies auf der Ebene der Junctionsproteine zu veranschaulichen, erfolgte im Anschluss die Anfertigung von Immunfluoreszenzfärbungen der Caco-2-Zellen. Die Inkubation der Zellen mit den Zellüberständen wurde einen Tag vor Erreichen der Konfluenz (C-1) durchgeführt. Am Tag der Konfluenz (C = 0) wurden die Zellen fixiert und für die Färbung präpariert. Danach wurden Bilder mit einem Konfokalmikroskop aufgenommen.

Das Verteilungsmuster der Junctionsproteine ließ bei den Kontrollzellen, die lediglich mit Medium inkubiert wurden, bereits einen geschlossenen Enterozyten-Monolayer erkennen. Die Junctionsproteine waren jedoch noch nicht ausschließlich an den Zellgrenzen lokalisiert, sondern zeigten ein diffuses Verteilungsmuster. Dies betraf alle drei Klassen der Junctionsproteine. Im Gegensatz dazu zeigten die mit rGDNF (100 ng/ml) oder EGC<sup>+/+</sup>-Überstand inkubierten Zellen einen besser differenzierten Enterozyten-Monolayer. Dieser war an der vermehrt auf die Zellgrenzen beschränkten Distribution der Junctionsproteine zu erkennen. Vor allem bei Dsg 2 war der typische punktförmige Verlauf innerhalb der Zellgrenzen auszumachen. Aber auch Cl 1 und 5 sowie E-Cadherin wirkten geordneter. Die mit EGC<sup>GDNF<sup>KD</sup></sup>- oder EGC<sup>GDNF<sup>depl</sup></sup>-Zellüberstand inkubierten Zellen ähnelten hingegen den Kontrollzellen und präsentierten ein eher diffuses Erscheinungsbild der Junctionsproteine.



**Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung von Caco-2-Zellen unter verschiedenen Versuchsbedingungen**

Sowohl die mit rGDNF als auch die mit EGC<sup>+/+</sup>-Zellüberstand behandelten Zellen zeigten eine Linearisierung der Zell-Zell-Kontakte im gerade erreichten Konfluenzstadium. Die unter Kontrollbedingungen sowie mit GDNF-defizienten Zellüberständen inkubierten Zellen ließen zwar einen geschlossenen Zell-Monolayer erkennen, jedoch war das Expressionsmuster der Junctionsproteine weitaus diffuser (Maßstabsbalken = 20 µm, Stichprobengröße: N = 3).

*Quelle: Eigene Darstellung*

### **3.3 GDNF-Effekte auf Enterozyten sind RET-Rezeptor-abhängig.**

GDNF fungiert als Ligand des Multikinase-Rezeptor-Komplexes RET. Diese Wirkungsbeziehung wurde bisher nur für Zelltypen im ZNS und im Zusammenhang mit Schilddrüsenkarzinomen aufgezeigt (Takahashi 2001; Ibáñez 2013b). Um die Signaltransduktion über den RET-Rezeptor auch in Enterozyten zu verifizieren bzw. zu blockieren, wurde bei einem ersten Versuchsaufbau ein spezifischer RET-Inhibitor und im weiteren Verlauf eine RET-spezifische siRNA verwendet.

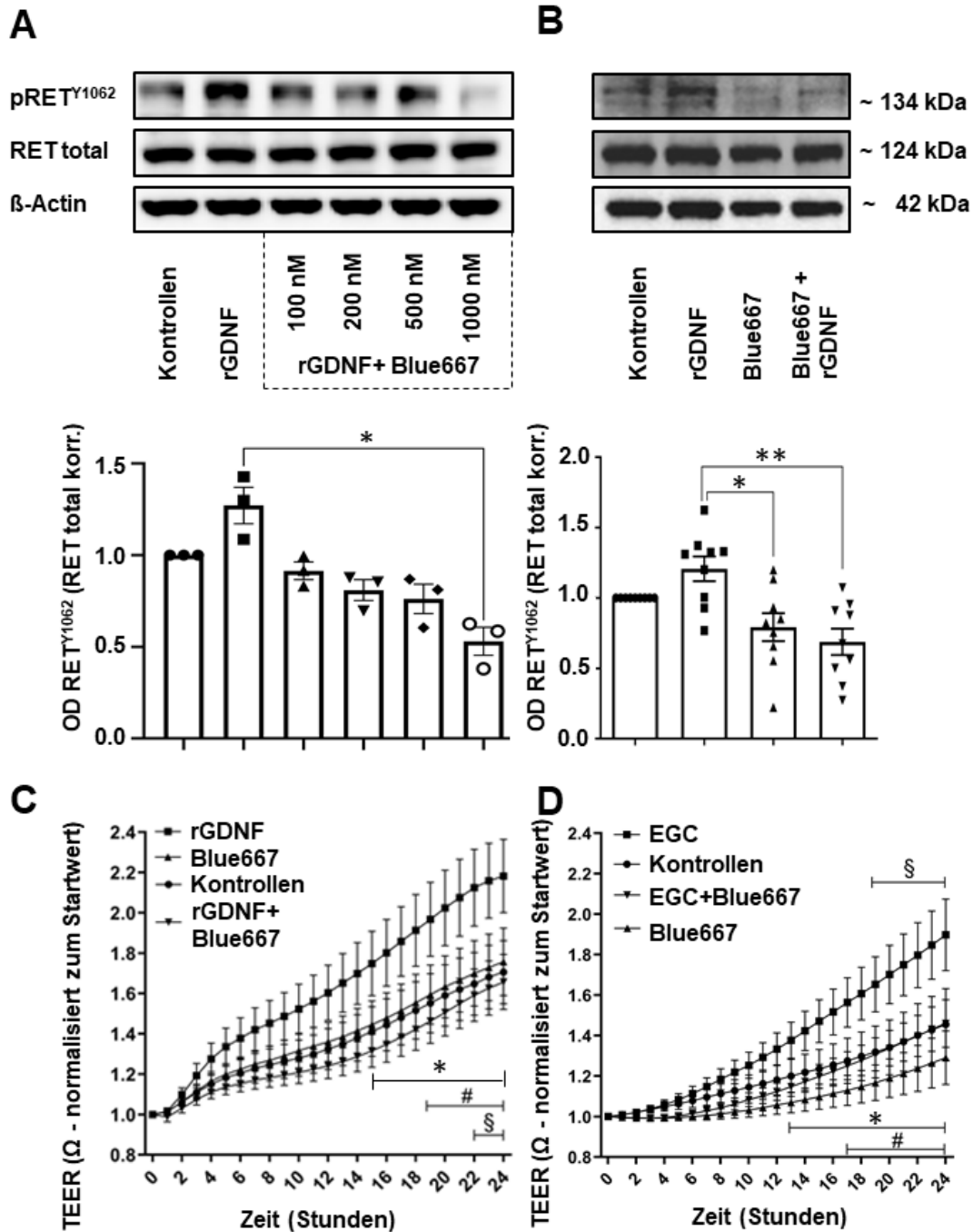
#### **3.3.1 Behandlung mit Blue667**

Blue667 inhibiert die Phosphorylierungsstelle Tyr-1062 (Subbiah et al. 2018). Diese nimmt eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von RET ein, wobei die Autophosphorylierung an Tyr-1602 einen kritischen Schritt für die Aktivierung des Ras/MAP-Kinase-Pfades und der PI3-Kinase/AKT darstellt (Ibáñez 2013a).

Da bisher keine Daten zur Behandlung von Darmepithelzellen mit dem genannten Medikament existierten, wurden Caco-2-Zellen auf 6-Well-Platten bis zum Erreichen des C-1-Stadiums kultiviert. Danach erfolgte eine zweistündige Inkubation der Zellen mit dem RET-Inhibitor mit Konzentrationen von 100 nM bis 1  $\mu$ M. Anschließend wurde eine Behandlung mit rGDNF (100 ng/ml) vorgenommen, wobei sich, wenn auch nicht signifikant, eine erhöhte Phosphorylierungsrate an pRET<sup>Y1062</sup> ergab. In den gleichzeitig durchgeführten Dosis-Wirkungs-Experimenten mit Caco-2-Zellen konnte eine effektive Inhibition (59 %) der GDNF-induzierten Phosphorylierung ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M festgestellt werden (OD: 1,27 vs. 0,53  $\pm$  0,09).

In einer ergänzenden Versuchsreihe konnte die effektive Hemmung der GDNF-induzierten Phosphorylierung von pRET durch eine Dosis von 1  $\mu$ M Blue667 bei einer größeren Stichprobenanalyse bestätigt werden (OD: 1,21 vs. 0,68  $\pm$  0,11). Zusätzlich wurden in Western-Blot-Untersuchungen eine tendenziell vermehrte Phosphorylierung von RET sowie eine Reduktion der Tyrosin Kinaseaktivität auch bei nicht durch rGDNF stimulierten Zellen beobachtet (OD: 1,21 vs. 0,79  $\pm$  0,11).

In den darauffolgenden Messungen des TEER konnten durch den Einsatz des RET-Inhibitors die Effekte sowohl von rGDNF als auch durch EGC-Überstand erfolgreich blockiert werden. Die Applikation von rGDNF erhöhte den TEER nach 24 Stunden in Abwesenheit des Inhibitors um den Faktor 1,3 gegenüber Kontrollen [TEER: 2,18 vs. 1,70  $\pm$  0,16 ( $\Omega$ )]. Eine Steigerung des TEER um den Faktor 1,3 gegenüber Kontrollen zeigte ebenso die Inkubation der Zellen mit EGC-Überstand [TEER: 1,90 vs. 1,45  $\pm$  0,12 ( $\Omega$ )]. Bei Hinzugabe des Inhibitors konnte weder nach Applikation von rGDNF noch nach der Hinzugabe von EGC-Überstand eine signifikante Erhöhung des TEER gegenüber Kontrollen erreicht werden.



**Abbildung 18: Der Ret-Inhibitor Blue667 hemmt GDNF-Effekte auf Enterozyten**

A: Die Abbildung zeigt die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Blue667 und der RET-Phosphorylierung an. Eine signifikante Hemmung konnte ab einer Dosis von 1  $\mu\text{M}$  erreicht werden. Statistische Tests: Kruskal-Wallis-Test und D'Agostino-&-Pearson-Normalitätstest, \* $p < 0,05$  (Stichprobengröße:  $N = 3$ ).

B: Durch den Einsatz des spezifischen RET-Inhibitors konnte die Phosphorylierung am Tyrosinrest 1062 nach GDNF-Stimulation reduziert werden. Auch zeigte sich eine Reduktion der Tyrosinkinaseaktivität in unbehandelten Zellen nach Zugabe von Blue667. Statistische Tests: Kruskal-Wallis-Test und D'Agostino-&-Pearson-Normalitätstest, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (Stichprobengröße:  $N = 5$ ,  $n = 9$ ).

C: Nach der Behandlung mit dem RET-Inhibitor zeigten die Enterozyten postinterventionell keine durch rGDNF beschleunigte Reifung der Barrierefunktion in der Messung des TEER (ECIS) mehr. Statistische Tests: Two-way Anova und D'Agostino-&-Pearson-Normalitätstest, \* $p < 0,05$  GDNF signifikant gegenüber Blue667+GDNF, # $p < 0,05$  GDNF signifikant gegenüber Kontrollen, §  $p < 0,05$  GDNF signifikant gegenüber Blue667 (Stichprobengröße:  $N = 5$ ,  $n = 10$ ).

D: Die Messung des TEER bestätigte, dass auch bei der Applikation von EGC-Überstand der verwendete RET-Inhibitor den GDNF-Effekt blockierte. Statistische Tests: Two-way Anova und D'Agostino-&-Pearson-Normalitätstest, \* $p < 0,05$  EGC signifikant gegenüber Blue667, # $p < 0,05$  EGC signifikant gegenüber EGC+Blue667, §  $p < 0,05$  EGC signifikant gegenüber Kontrollen (Stichprobengröße:  $N = 6$ ,  $n = 12$ ).

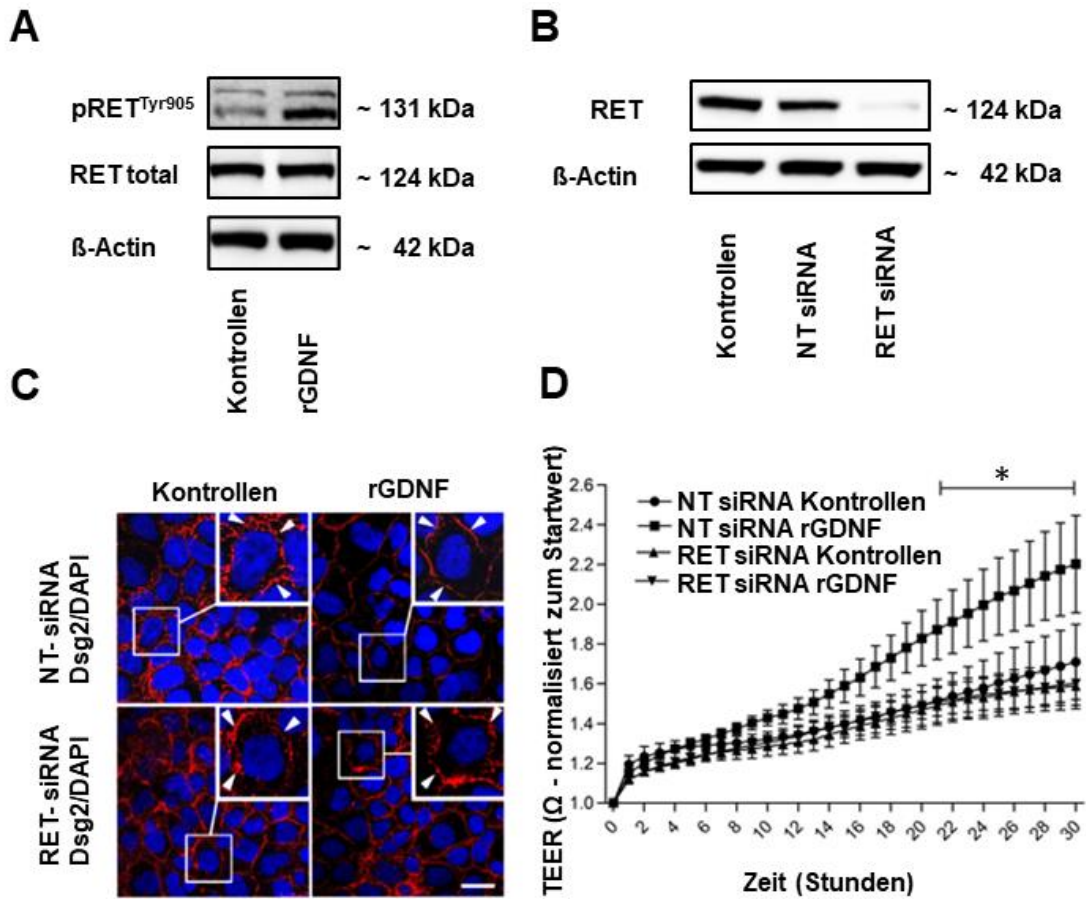
*Quelle: Eigene Darstellung*

### 3.3.2 Behandlung mit RET-siRNA

Der zweite Versuchsaufbau beinhaltete den Einsatz von RET-spezifischer siRNA. Analog zum Einsatz des RET-Inhibitors wurde hierbei zuerst die Phosphorylierung des RET-Rezeptors anhand von Western-Blot-Untersuchungen überprüft. Diesmal wurde jedoch die Phosphorylierungsstelle Tyr-905 untersucht. Diese stellt einen Phosphorylierungsrest sehr weit Upstream in der Phosphorylierungskaskade von RET dar und wird für die generelle Aktivierung der Tyrosinkinase benötigt (Ibáñez 2013b). Anschließend erfolgte die Transfektion der Caco-2-Zellen mit RET-siRNA. Hierbei wurde der Transfektionserfolg ebenfalls mit einer Western-Blot-Untersuchung verifiziert.

Um die funktionellen Auswirkungen der Transfektion mit RET-siRNA zu testen, wurden subkonfluente Caco-2-Zellen auf Elektroden zur Messung des TEER ausgesät und 24 Stunden später transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Behandlung mit 100 ng/ml rGDNF und die Widerstandmessung wurde gestartet. Als Kontrollen dienten mit NT-siRNA transfizierte Zellen. Hierbei konnte keine Erhöhung des TEER in der RET-siRNA-Kohorte nach GDNF-Behandlung gemessen werden. Lediglich die mit NT-siRNA transfizierten Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung des TEER im Endpunkt der Messung um den Faktor 1,3 gegenüber Kontrollen [TEER: 2,20 vs.  $1,71 \pm 0,13$  ( $\Omega$ )].

Ebenso zeigten angefertigte Immunfluoreszenzbilder der transfizierten Zellen im Stadium C = 0 keinen GDNF-Effekt auf Dsg2, wenn RET-siRNA verwendet wurde. Die mit NT-siRNA transfizierten Kontrollen wiesen dazu im Vergleich jedoch eine deutliche Linearisierung der desmosomalen Zell-Zell-Kontakte auf.



**Abbildung 19: GDNF-Effekte auf Enterozyten sind RET-abhängig**

A: Die Abbildung zeigt eine erhöhte Phosphorylierungsrate am Tyrosinrest 905 infolge einer GDNF-Behandlung (Stichprobengröße: N = 3).

B: In der beispielhaften Western-Blot-Abbildung ist die Expression des RET-Rezeptors nach Transfektion mit NT- und RET-siRNA festzustellen (Stichprobengröße: N = 3).

C: Die Immunfluoreszenzfärbung in 62-facher Vergrößerung lässt eine deutliche Linearisierung der Dsg2-Zellkontakte nach GDNF-Behandlung erkennen, die nach der Transfektion mit RET-siRNA nicht mehr zu beobachten war (Maßstabsbalken = 20 µm, Zoomabschnitt mit 2,5-facher Vergrößerung, Stichprobengröße: N = 3).

D: Die Transfektion mit RET-siRNA blockierte die durch GDNF induzierte schnellere Barrierereifung der Enterozyten, was sich durch eine Entwicklung des TEER auf Kontrollniveau ausdrückte. Statistische Tests: Two-way Anova und D'Agostino-&-Pearson-Normalitätstest, \*p < 0,05 GDNF signifikant gegenüber Kontrollen (Stichprobengröße: N = 4, n = 8).

Quelle: Eigene Darstellung

### **3.4 GDNF und enterische Inflammation**

In diesem Abschnitt wird der Zusammenhang zwischen GDNF und enterischer Inflammation thematisiert. Einleitend erfolgte eine Untersuchung, inwiefern inflammatorische Stimuli die GDNF-Expression in EGC beeinflussen und ob diese in den verwendeten Konzentrationen eine Apoptose der Zellen zur Folge haben. Abschließend wurden die Auswirkungen von EGC auf die intestinale Barriere in einem In-vitro-Inflammationsmodell untersucht.

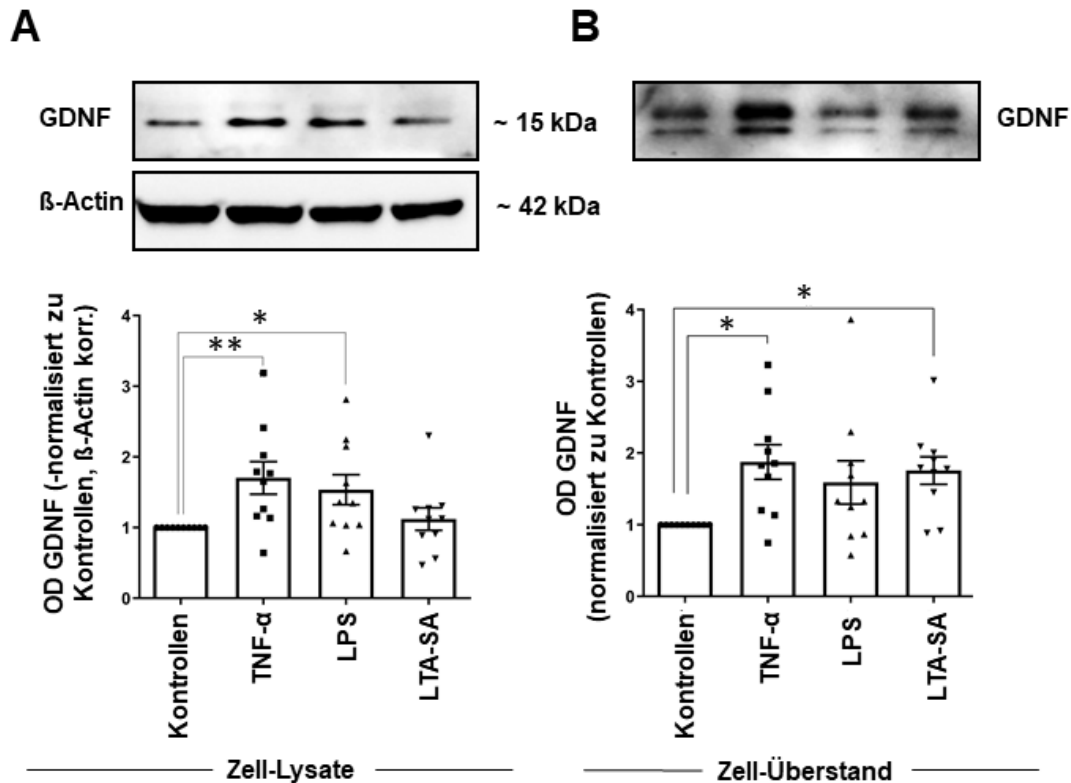
#### **3.4.1 Die Inkubation mit Zytokinen steigert die GDNF-Expression und Sekretion in CRL-2690-Zellen.**

Für die nachfolgenden Analysen wurden EGC auf 6-Well-Platten bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Anschließend erfolgten ein Mediumwechsel auf ein FCS-freies Zellmedium und die Zugabe von unterschiedlichen Zytokinen. Die Zellen wurden mit TNF- $\alpha$  (100 ng/ml), LPS (100 ng/ml) und LTA-SA (500 ng/ml) für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde der Zellüberstand asserviert und die Zellen wurden zu Lysaten verarbeitet, damit die GDNF-Expression mithilfe einer Western-Blot-Untersuchung analysiert werden konnte. Dabei wurde der GDNF-Gehalt in den Zell-Lysaten und im Zellüberstand getrennt voneinander untersucht.

In den Zell-Lysaten zeigte sich im Western Blot nach der Inkubation mit TNF- $\alpha$  eine um den Faktor 1,7 (OD:  $1,70 \pm 0,25$ ) erhöhte Expression von GDNF gegenüber unbehandelten Kontrollen. Auch die Applikation von LPS (OD:  $1,53 \pm 0,25$ ) erhöhte das gemessene GDNF signifikant. Keine relevante Expressionserhöhung konnte nach der Zugabe von LTA-SA (OD:  $1,12 \pm 0,25$ ) gemessen werden.

Im korrespondierenden Zellüberstand wurde unter allen der erwähnten Bedingungen ein erhöhter GDNF-Spiegel detektiert. Die Behandlung mit LPS (OD:  $1,59 \pm 0,30$ ) erhöhte das gemessene GDNF-Signal im Western Blot um den Faktor 1,6, wobei aber das Signifikanzniveau verfehlt wurde. TNF- $\alpha$  (OD:  $1,88 \pm 0,30$ ) und LTA-SA (OD:  $1,75 \pm 0,30$ ) führten hingegen zu einer signifikanten Erhöhung des gemessenen GDNF-Signals im Zellüberstand.





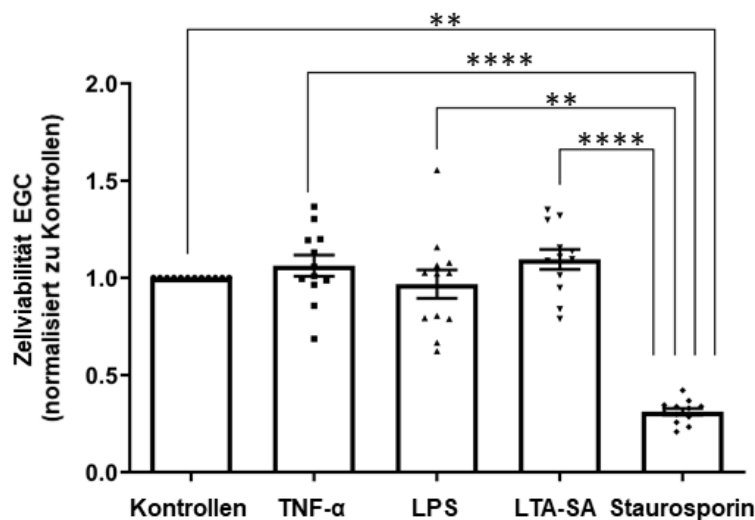
**Abbildung 20: GDNF-Expression und Sekretion in EGC nach Zytokin-Behandlung**

A: Das intrazellulär detektierte GDNF stieg nach der Behandlung mit TNF- $\alpha$  und LPS signifikant an. Statistische Tests: Kruskal-Wallis-Test und D'Agostino-&-Pearson-Normalitätstest, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (Stichprobengröße:  $N = 5$ ,  $n = 10$ ).

B: Das im Zellüberstand detektierte GDNF stieg nach der Behandlung mit TNF- $\alpha$  und LTA-SA signifikant an. Statistische Tests: Kruskal-Wallis-Test und D'Agostino-&-Pearson-Normalitätstest, \* $p < 0,05$  (Stichprobengröße:  $N = 5$ ,  $n = 10$ ).

Quelle: Eigene Darstellung

Um ausschließen zu können, dass die detektierten Veränderungen im Überstand der Zellen auf eine durch die Behandlung induzierte Apoptose der Gliazellen zurückzuführen waren, wurde ein Zell-Viabilitäts-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse des ATP-basierten Tests konnten hierbei eine relevante Apoptose der Zellen nach 24-stündiger Zytokin-Behandlung in den verwendeten Konzentrationen ausschließen. Es kam zu keiner signifikanten Verringerung der Zellzahl unter den Untersuchungsbedingungen [(OD: TNF- $\alpha$ :  $1,06 \pm 0,07$ ), (OD: LPS:  $0,97 \pm 0,07$ ), (OD: LTA-SA:  $1,09 \pm 0,07$ ), (OD: Kontrollen:  $1,00$ )]. Hingegen konnte in der Positivkontrolle mit Staurosporin ( $1 \mu\text{M}$ ) eine um 69 % (OD:  $0,31 \pm 0,07$ ) verringerte Zellzahl gegenüber den unbehandelten Kontrollen detektiert werden.



**Abbildung 21: Zellviabilität nach Zytokin-Behandlung**

Die Behandlung mit Zytokinen zeigte keine relevanten Auswirkungen auf das Zellüberleben der EGC. Statistische Tests: Kruskal-Wallis-Test und D'Agostino-&-Pearson-Normalitätstest, \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001, (Stichprobengröße: N = 3, n = 12).

Quelle: Eigene Darstellung

In Summe wird anhand der Ergebnisse deutlich, dass sowohl die intrazelluläre Expression von GDNF als auch die Sekretion in den Zellüberstand durch die Behandlung mit inflammatorischen Stimuli gesteigert werden kann. Dies entspricht bereits publizierten Daten mit anderen Gliazelllinien (von Boyen et al. 2006) und wurde damit auch für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen verifiziert.

### 3.4.2 GDNF stabilisiert die Barrierefunktion von Enterozyten im Inflammationsmodell über den RET-Rezeptor.

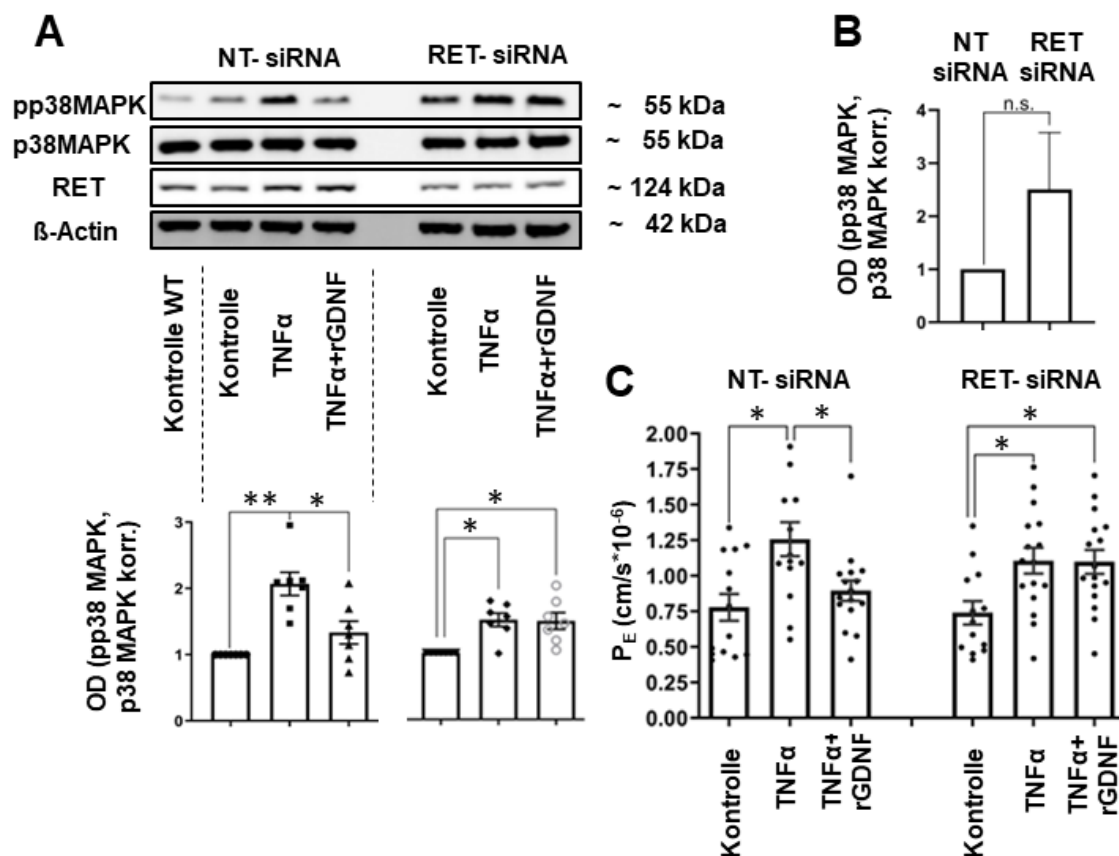
Um die RET- bzw. GDNF-abhängigen Effekte auch in einem In-vitro-Inflammationsmodell zeigen zu können, wurden drei Versuchsansätze angewandt: Die Inhibition des RET-Rezeptors erfolgte einmal mit RET-siRNA und im Ko-Kultur-Modell pharmakologisch durch Blue667. Des Weiteren wurde die bereits etablierte EGC-GDNF-knock-down-Zelllinie verwendet. Die Simulation einer Entzündungsreaktion erfolgte bei allen drei Versuchsaufbauten mit der Applikation von TNF- $\alpha$  (100 ng/ml), wobei die Behandlung der

Zellen auf 24 Stunden beschränkt war und erst nach dem Erreichen des Konfluenzstadiums ( $C = 0$ ) der Caco-2-Zellen begann. Während des gesamten Interventionszeitraums wurde ausschließlich FCS-freies Medium verwendet.

### **RET-Rezeptor siRNA-Modell:**

Für die Herunterregulation des RET-Rezeptors mit siRNA wurden die Epithelzellen auf Transwell-Filtersystemen ausgesät, nach 24 Stunden transfiziert und anschließend bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Danach erfolgte die Behandlung mit  $\text{TNF-}\alpha$  und rGDNF. Durch die Behandlung mit rGDNF konnten der Zytokin-induzierte Zusammenbruch der Barrierefunktion in der NT-siRNA-Kohorte und der damit verbundene erhöhte Flux von FITC-Dextran über die Membran deutlich abgeschwächt werden [ $P_E$ : 1,26 vs.  $0,89 \pm 0,13$  ( $\text{cm/s} * 10^{-6}$ )]. Jedoch zeigte sich dies nicht in den mit RET-siRNA transfizierten Zellen [ $P_E$ : 1,11 vs.  $1,10 \pm 0,12$  ( $\text{cm/s} * 10^{-6}$ )].

Da ein Teil der barrierestabilisierenden Eigenschaften von GDNF über die Hemmung der Phosphorylierung der p38-MAPK vermittelt wird (Huang et al. 2014; Meir et al. 2015; Xiao et al. 2017), wurde dies im Zusammenhang mit der Expression des RET-Rezeptors evaluiert. Western-Blot-Analysen der transfizierten Zellen ergaben, dass die Phosphorylierung der p38-MAPK in der mit NT-siRNA transfizierten Kontrollgruppe (OD: 1,00 vs.  $2,07 \pm 0,20$ ) sowie in der RET-siRNA-Gruppe (OD: 1,00 vs.  $1,49 \pm 0,13$ ) signifikant durch die Zytokin-Behandlung gesteigert wurde. Dieser Effekt wurde durch die gleichzeitige Gabe von rGDNF abgeschwächt. Jedoch konnte dies nur bei NT-siRNA-transfizierten Zellen (OD: 2,07 vs.  $1,33 \pm 0,20$ ) beobachtet werden und nicht bei der Verwendung von RET-siRNA (OD: 1,49 vs.  $1,48 \pm 0,13$ ). Gleichzeitig konnte auch ohne Zytokin-Stimulation eine tendenziell, aber nicht signifikant vermehrte Phosphorylierung der p38-MAPK nach RET-siRNA-Transfektion gegenüber der NT-siRNA beobachtet werden (OD: 1,00 vs.  $2,51 \pm 1,07$ ).



**Abbildung 22: GDNF- und RET-Rezeptor-vermittelter barriestabilisierender Effekt im Inflam-mationsmodell**

**A:** Western-Blot-Analysen der p38-MAPK bei mit NT-siRNA transfizierten Zellen zeigten eine erhöhte Phosphorylierung unter dem Einfluss von TNF $\alpha$ . Diese war durch die Zugabe von rGDNF reversibel. Bei Zellen, die mit RET-siRNA transfiziert wurden, konnte durch die gleichzeitige Applikation von rGDNF und TNF $\alpha$  hingegen keine verminderte Phosphorylierung von der p38-MAPK beobachtet werden. Statistische Tests: Kruskal-Wallis-Test und D'Agostino-Pearson-Normalitätstest, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (Stichprobengröße:  $N = 4$ ,  $n = 7$ ).

**B:** Die Transfektion mit RET-siRNA zeigte gegenüber NT-siRNA auch ohne Zytokin-Stimulation eine erhöhte Phosphorylierung von p38-MAPK, wenngleich dieser Unterschied auch nicht statistisch signifikant war. Statistische Tests: Wilcoxon-Signed-Ranked-Test und D'Agostino-Pearson-Normalitätstest, n. s. (Stichprobengröße:  $N = 4$ ,  $n = 7$ ).

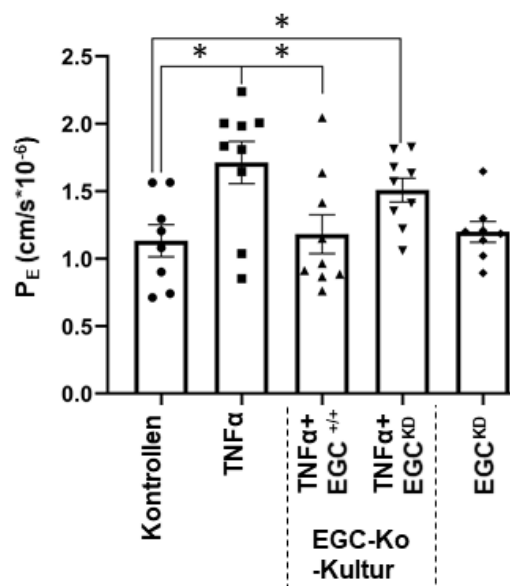
**C:** Die Stimulation mit rGDNF konnte den TNF $\alpha$ -vermittelten Barrierezusammenbruch bei der Verwendung von NT-siRNA deutlich abschwächen, was sich durch den niedrigeren  $P_E$  ausdrückte. Dieser Effekt konnte nicht bei der Verwendung von RET-siRNA gefunden werden. Statistische Tests: Kruskal-Wallis-Test und D'Agostino-Pearson-Normalitätstest, \* $p < 0,05$  (Stichprobengröße:  $N = 7$ ,  $n = 14$ ).

Quelle: Eigene Darstellung

### Ko-Kultur-Modell:

In einem zweiten Versuchsansatz erfolgte die Evaluierung des Effektes von glialen GDNF auf die intestinale Barriere im Inflammationssetting. Caco-2-Zellen wurden auf

Transwell-Filterssystemen ausgesät und bis zum Erreichen des Stadium C - 1 kultiviert. Die weitere Kultivierung erfolgte im Ko-Kultur-Modell mit EGC, wobei FCS-freies Medium verwendet wurde. Es wurden für diesen Schritt sowohl Wildtyp-EGC ( $EGC^{+/+}$ ) als auch GDNF-Knockdown-Zellen ( $EGC^{KD}$ ) verwendet. Dabei wurden die Zellen bis zum Stadium der Konfluenz ( $C = 0$ ) inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von  $TNF-\alpha$  (100 ng/ml) für 24 Stunden, nach deren Ablauf sich eine Fluoreszenzmessung mit FITC-Dextran im Transwell-Assay anschloss. Caco-2-Zellen ohne Ko-Kultur, die mit  $TNF-\alpha$  behandelt wurden, zeigten hierbei eine um den Faktor 1,5 signifikant erhöhte transepitheliale Permeabilität [ $P_E = 1,73 \pm 0,18$  ( $cm/s * 10^{-6}$ )] gegenüber Kontrollen [ $P_E = 1,13 \pm 0,18$  ( $cm/s * 10^{-6}$ )]. Die Ko-Kultivierung mit  $EGC^{+/+}$  konnte den Zytokin-induzierten Barrierezusammenbruch fast vollständig abschwächen [ $P_E = 1,18 \pm 0,17$  ( $cm/s * 10^{-6}$ )]. Dieser Effekt war hingegen in der Ko-Kultivierung mit  $EGC^{KD}$  kaum ausgeprägt [ $P_E = 1,51 \pm 0,17$  ( $cm/s * 10^{-6}$ )]. Die Ko-Kultur von Caco-2-Zellen mit  $EGC^{KD}$  zeigte ohne die Zugabe von  $TNF-\alpha$  keinen negativen Effekt auf die Barrierepermeabilität [ $P_E = 1,19 \pm 0,18$  ( $cm/s * 10^{-6}$ )]. Diese unterschied sich nicht wesentlich von der in den Kontrollen.



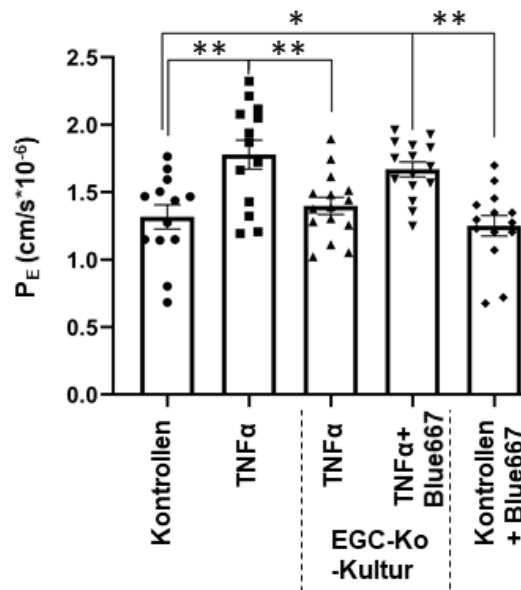
**Abbildung 23: Barrierestabilisierende Wirkung einer EGC-Ko-Kultur im Inflammationsmodell**

Die Ko-Kultivierung von Caco-2-Zellen mit EGC ( $EGC^{+/+}$ ) führte zu einer Abschwächung des  $TNF-\alpha$ -induzierten Effektes auf den  $P_E$ . GDNF-defiziente EGC ( $EGC^{KD}$ ) hatten dazu im Vergleich keinen signifikanten Effekt auf die Barrierepermeabilität. Statistische Tests: One-way-Anova und D'Agostino-Pearson-Normalitätstest,  $*p < 0,05$  (Stichprobengröße:  $N = 5, n = 9$ ).

Quelle: Eigene Darstellung

## RET-Inhibitor-Modell:

In einem letzten Versuchsansatz wurde untersucht, ob der bereits an anderer Stelle verwendete RET-Inhibitor (Blue667) auch unter Inflammationsbedingungen funktioniert. Hierfür wurde der Versuchsaufbau im Ko-Kultur-Modell durch die Zugabe von Blue667 (1  $\mu$ M) ergänzt. Dieser wurde zwei Stunden vor der Zugabe des Zytokins appliziert. Jedoch wurden für die Ko-Kultur jetzt ausschließlich EGC<sup>+/+</sup> verwendet. Die Inkubation mit TNF- $\alpha$  führte auch hier zu einer signifikanten Erhöhung der Barrierepermeabilität für FITC-Dextran [ $P_E = 1,78 \pm 0,11$  (cm/s \*10<sup>-6</sup>)] gegenüber unbehandelten Kontrollen [ $P_E = 1,31 \pm 0,11$  (cm/s \*10<sup>-6</sup>)] und auch die barriestabilisierende Wirkung der EGC ließ sich reproduzieren [ $P_E = 1,40 \pm 0,11$  (cm/s \*10<sup>-6</sup>)]. Durch die Zugabe des RET-Inhibitors in Kombination mit TNF- $\alpha$  wurde der stabilisierende Effekt der EGC fast vollständig aufgehoben [ $P_E = 1,70 \pm 0,11$  (cm/s \*10<sup>-6</sup>)]. Hingegen zeigte die alleinige Zugabe von Blue667 keinen signifikanten Effekt [ $P_E = 1,25 \pm 0,11$  (cm/s \*10<sup>-6</sup>)] auf die Barrierepermeabilität gegenüber den Kontrollen.

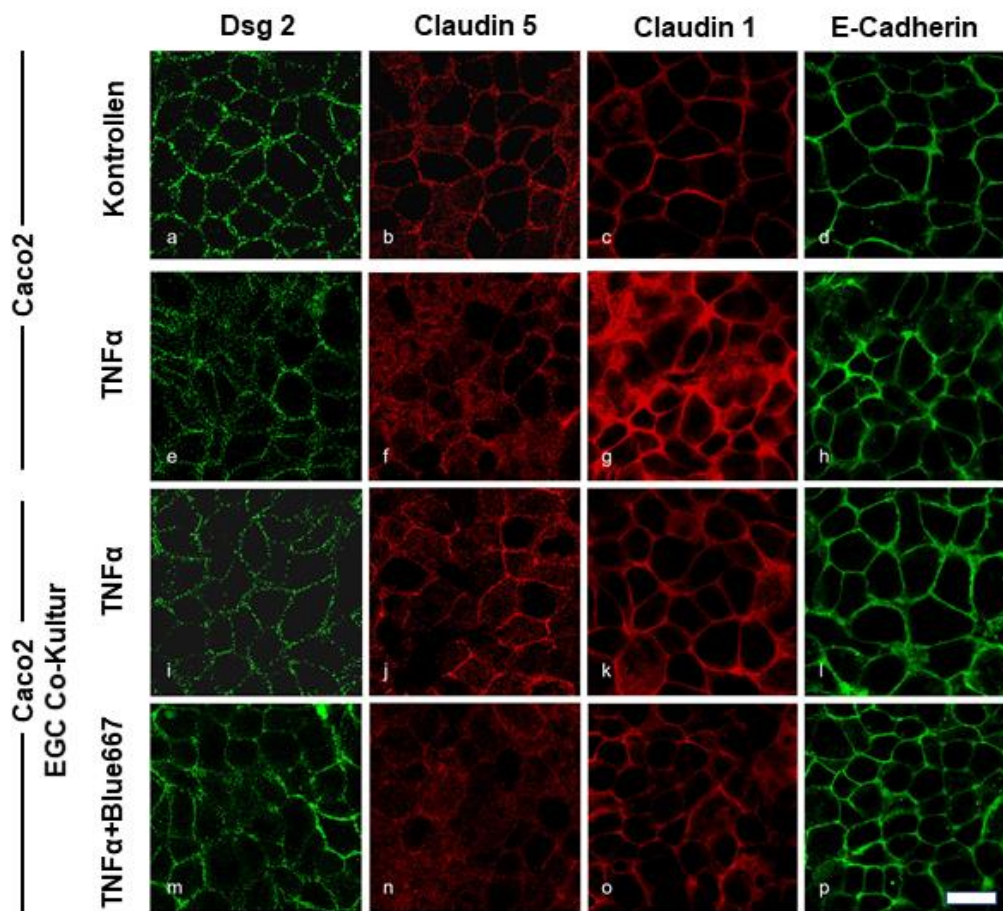


**Abbildung 24: Eine RET-Inhibition schwächt den barriestabilisierenden Effekt von EGC ab.**

Die Zugabe des RET-Inhibitors Blue667 schwächte den barriestabilisierenden Effekt von EGC in den durchgeführten Transwell-Assays deutlich ab. Statistische Tests: One-way-Anova und D'Agostino-Pearson-Normalitätstest, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (Stichprobengröße:  $N = 7$ ,  $n = 13$ ).

Quelle: Eigene Darstellung

Um die gezeigten Effekte auf die Barrierefunktion von Enterozyten zu präzisieren und eine Aussage bezüglich der Junctionsproteine treffen zu können, wurden die mit Caco-2-Zellen bewachsenen Transwell-Filter im Anschluss an die Permeabilitätsexperimente einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen. Hierbei erfolgte eine Färbung von Vertretern der drei bekannten Klassen von Junctionsproteinen des Schlussleistenkomplexes. Deutlich zu erkennen war ein TNF- $\alpha$ -induzierter Verlust von Dsg2 an den Zellgrenzen. Ähnlich verhielt es sich mit den Tight-Junction-Proteinen Claudin 1 und 5. Kein relevanter Effekt war auf das Adhärensprotein E-Cadherin zu beobachten. Die Ko-Kultivierung mit EGC konnte den Zytokin-Effekt deutlich abschwächen und die Junctionsproteine blieben weiterhin an den Zellgrenzen lokalisiert. Dieser Effekt wurde durch den RET-Inhibitor weitgehend aufgehoben.



**Abbildung 25: Expressionsmuster von Junctionsproteinen nach der Behandlung mit TNF- $\alpha$**

Eine Ko-Kultivierung mit EGC führte zu einer Abschwächung der Zytokin-vermittelten Umverteilung von Junctionsproteinen. Die mit EGC kultivierten Caco-2-Zellen zeigten trotz TNF- $\alpha$ -Applikation ein lineares

und auf die Zellgrenzen begrenztes Expressionsmuster der Junctionsproteine, vergleichbar mit den Kontrollen. Dieser Effekt war durch die Behandlung mit Blue667 reversibel (Maßstabsbalken = 20 µm, Stichprobengröße: N = 3).

*Quelle: Eigene Darstellung*

Anhand der beschriebenen Versuche wird ersichtlich, dass EGC über die Sekretion von GDNF die Barrierefunktion der Enterozyten während einer Inflamationsreaktion schützen. Dieser Mechanismus ist RET-Rezeptor abhängig. Die Daten des ersten Versuchsaufbaus mit RET-siRNA legen zudem nahe, dass die barriestabilisierende Wirkung von GDNF über eine Phosphorylierungsinhibition der p38-MAPK vermittelt wird.

### **3.5 Relevanz der intestinalen GDNF-Expression bei CED**

In diesem Unterkapitel wird der Zusammenhang zwischen GDNF und einem möglichen veränderten Expressionsmuster bei CED betrachtet. Um einen Bezug zu CED herzustellen und eine translationale Relevanz der vorangegangenen Untersuchungen feststellen zu können, wurden Patienten-Proben auf ihren GDNF-Gehalt hin analysiert, wobei die transmurale und die mukosale GDNF-Expression getrennt voneinander analysiert wurden.

#### **3.5.1 Histopathologische Einteilung der verwendeten CED-Proben**

Die Methode der Probengewinnung und Verarbeitung des humanen Gewebes wurde im Material- und Methoden-Teil bereits ausführlich beschrieben. Initial erfolgte eine histopathologische Begutachtung zur Beurteilung der Inflammation des verwendeten Resektionsmaterials. In Paraffin eingebettete Gewebeproben wurden mit Hämatoxylin und Eosin [(H&E)-Färbung] gefärbt und anschließend einfach verblindet durch einen Pathologen beurteilt, wobei ein modifizierter Inflammations-Score verwendet wurde (Truelove and Richards 1956). Hierbei stehen die Zahlen 1 bis 3 für folgende histopathologische Befunde:



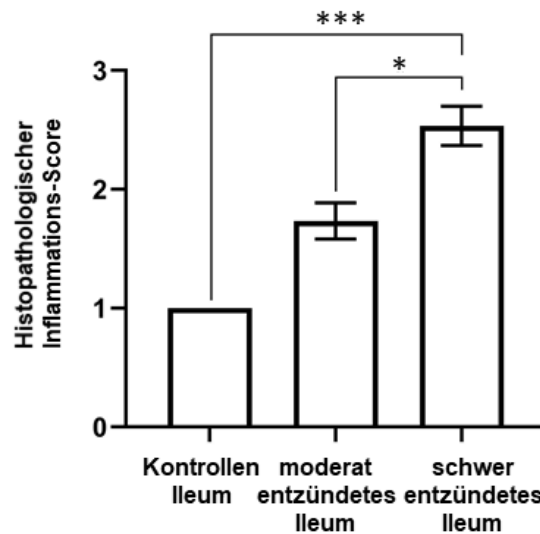
**Tabelle 6: Einteilung histopathologischer Befund**

<b>1</b>	= keine Entzündung, Schleimhaut ist entzündungsfrei, es gibt keine Anzeichen von Erosion oder Lymphozyten-Infiltration
<b>2</b>	= moderate Entzündung, das Epithel ist intakt, zeigt aber Anzeichen eines Ödems, einer interstiellen Blutung oder einer signifikanten Lymphozyten-Infiltration
<b>3</b>	= schwere Entzündung, die Oberfläche der Schleimhaut ist unregelmäßig und zeigt Brüche im Epithel, eine schwere Lymphozyten-Infiltration und die Bildung von Granulomen

*Quelle: Eigene Darstellung modifiziert nach Meir et al. 2020, S. 1477*

Anschließend wurden die in dieser Arbeit verwendeten Proben von Kontroll- und MC-Patienten mit der bestehenden Analyse abgeglichen. Hierbei zeigte keine der verwendeten Kontrollen eine Entzündungsaktivität. Die makroskopisch als nicht entzündet identifizierten Darmabschnitte wiesen im Mittelwert einen Entzündungswert von 1,73 ( $1,73 \pm 0,23$ ) auf und wurden fortan als moderat entzündet klassifiziert. Die als entzündet bewerteten Proben derselben Patienten besaßen hingegen einen durchschnittlichen Entzündungswert von 2,53 ( $2,53 \pm 0,20$ ) und wurden fortan als schwer entzündet bezeichnet.

An dieser Stelle ist darauf hinzuweisen, dass sich die pathologische Untersuchung des Untersuchungsgewebes auf Proben aus dem terminalen Ileum von Kontroll- und MC-Patienten beschränkte. Eine pathologische Bewertung der Kolonproben von Kontroll- und CU-Patienten fand nicht statt.



**Abbildung 26: Inflammations-Score der verwendeten Patientenproben des terminalen Ileums**

Die verblindete histopathologische Analyse des verwendeten Darmgewebes zeigt den Schweregrad der Entzündung der verwendeten Darmproben an. Signifikante Unterschiede ließen sich hier sowohl zwischen den verwendeten Kontrollen und dem stark entzündeten Gewebe wie auch zwischen dem moderat entzündeten und stark entzündeten Gewebe feststellen. Statistische Tests: Kruskal-Wallis-Test und D’Agostino-&-Pearson-Normalitätstest, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  [Stichprobengröße:  $n$  (Kontrollen) = 9,  $n$  (MC) = 15].

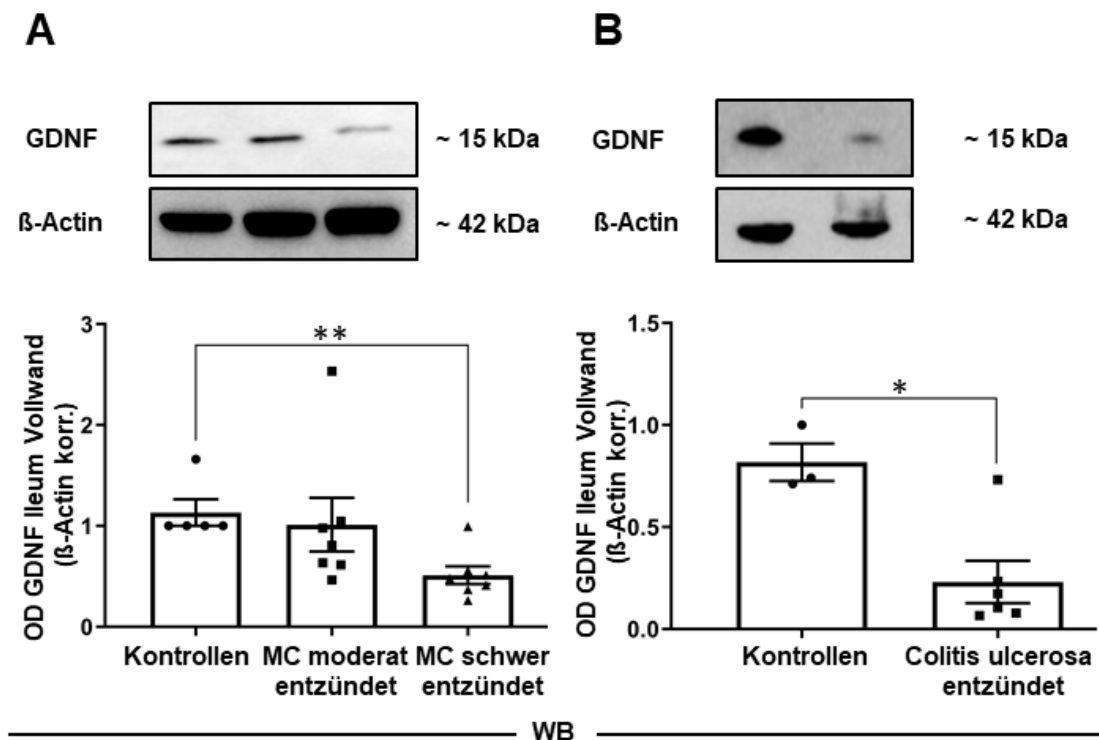
*Quelle: Eigene Darstellung*

### 3.5.2 Die GDNF-Expression im Intestinum ist bei CED-Patienten teilweise vermindert.

Um die Relevanz der intestinalen GDNF-Expression im Zusammenhang mit CED zu überprüfen, wurde eine Western-Blot-Analyse von Darmgewebeproben angefertigt. Bei den Gewebeproben handelte es sich um Vollwand-Proben, das heißt die gesamte Darmwand wurde zu einem Lysat verarbeitet und anschließend gegen einen GDNF-Antikörper inkubiert. Als Ladungskontrolle diente  $\beta$ -Actin. Es wurden hierbei Proben von MC- und CU-Patienten gegen Kontrollen überprüft. Als Bestätigungstests und um eine Quantifizierung der GDNF-Expression zu ermöglichen, erfolgte eine weitere Analyse mit einem ELISA-Assay.

Die Auswertung der OD zeigte eine um 55 % signifikant verminderte Expression von GDNF in schwer entzündeten Darmabschnitten von MC-Patienten (OD:  $0,51 \pm 0,28$ ) gegenüber Kontrollen (OD:  $1,12 \pm 0,28$ ). Die GDNF-Expression in moderat entzündeten Darmabschnitten (OD:  $1,01 \pm 0,28$ ) unterschied sich hingegen nicht wesentlich von der

in den Kontrollen. Die Expression von GDNF in Kolonproben von CU-Patienten (OD:  $0,23 \pm 0,16$ ) war ebenfalls um 72 % gegenüber Kontrollen (OD:  $0,81 \pm 0,16$ ) signifikant vermindert.



**Abbildung 27: GDNF-Expression der gesamten Darmwand bei CED im Western Blot**

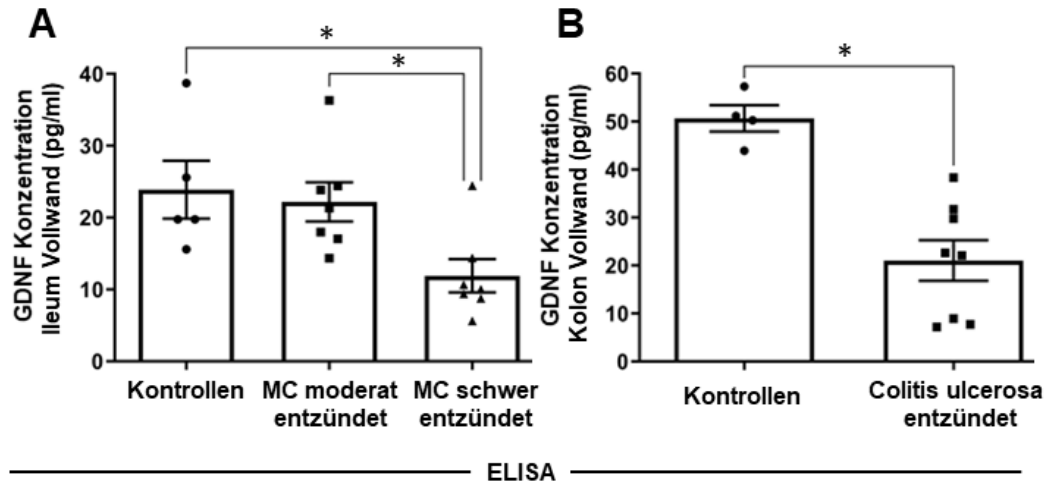
A: Die Western-Blot-Analyse von Patientenproben bestehend aus der gesamten Darmwand zeigte für MC-Patienten eine signifikante Verringerung der GDNF-Expression in stark entzündeten Darmabschnitten des terminalen Ileums gegenüber Kontrollpatienten (Statistische Tests: Kruskal-Wallis-Test und Shapiro-Wilk-Normalverteilungstest,  $**p < 0,01$  [Stichprobengröße: n (Kontrollen) = 5, n (MC) = 7]).

B: Die transmurale semiquantitative Analyse des Kolons von Patienten mit Colitis Ulcerosa präsentierte eine verringerte GDNF-Expression verglichen mit Kontrollen. Statistische Tests: Mann-Whitney-Test ( $*p < 0,05$ ) und Shapiro-Wilk-Normalverteilungstest,  $*p < 0,05$ , [Stichprobengröße: n (Kontrollen) = 3, n (CU) = 6].

Quelle: Eigene Darstellung

Um die gewonnenen Ergebnisse zu verifizieren und eine quantitative Aussage bezüglich der GDNF-Konzentration treffen zu können, wurde anschließend eine Analyse der Gewebelysate mittels eines ELISA durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden mithilfe einer BCA-Messung auf eine einheitliche Konzentration von 1 mg/ml gebracht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung deckten sich mit den Western-Blot-Analysen. So war die GDNF-Konzentration bei MC-Patienten in schwer entzündeten gegenüber den moderat

entzündeten Darmabschnitten [GDNF: 11,89 vs. 22,19 ± 3,93 (pg/ml)] und Kontrollen [GDNF: 23,87 ± 4,30 (pg/ml)] deutlich reduziert. Auch die GDNF-Konzentration der CU-Proben [GDNF: 21,05 ± 6,42 (pg/ml)] war mit einer Reduktion um 68 % verglichen mit den Kontrollen [GDNF: 50,67 ± 6,42 (pg/ml)] stark vermindert.



**Abbildung 28: GDNF-Konzentration der gesamten Darmwand bei CED im ELISA**

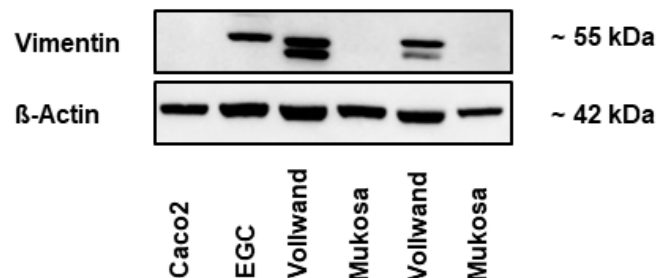
A/B: Die ELISA-Daten decken sich zum größten Teil mit den Western-Blot-Analysen. Zusätzlich erreicht jedoch die verminderte GDNF-Expression in stark entzündeten Proben des terminalen Ileums das vorgegebene Signifikanzniveau gegenüber den Proben aus weniger stark entzündeten Ileum-Abschnitten von MC-Patienten. Statistische Tests: Für A: One-way-Anova und Shapiro-Wilk-Normalverteilungstest, \* $p < 0,05$  [Stichprobengröße:  $n$  (Kontrollen) = 5,  $n$  (MC) = 7]. Für B: Student's t-Test und Shapiro-Wilk-Normalverteilungstest, \* $p < 0,05$  [Stichprobengröße:  $n$  (Kontrollen) = 4,  $n$  (CU) = 8].

Quelle: Eigene Darstellung

An dieser Stelle gilt es anzumerken, dass bei den verwendeten Colitis-Proben keine Unterscheidung bezüglich des Schweregrades der vorliegenden Inflammation stattfand. Da sich unerheblich davon die Ergebnisse von bereits publizierten Daten unterschieden, schloss sich eine erweiterte Untersuchung der GDNF-Expression an, wobei isoliert die Mukosa betrachtet wurde.

### 3.5.3 Die mukosale GDNF-Expression im Intestinum ist bei CED-Patienten teilweise erhöht.

In Bezug auf diese Thematik existiert bereits eine Publikation von van Boyen und Kollegen, in der eine höhere GDNF-Konzentration in Biopsien von CED-Patienten festgestellt werden konnte. Allerdings wurden keine Vollwand-Proben, sondern endoskopisch gewonnene Mukosa-Biopsien verarbeitet. Um die Diskrepanz zu bereits publizierten Daten der GDNF-Expression bei CED (von Boyen et al. 2011) zu klären, erfolgte im nachfolgenden Versuchsaufbau eine Mukosa-Dissektion. Da bei der mechanischen Trennung der Mukosa eine Kontamination mit Teilen des Plexus Submukosus nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde eine Validierung mit Nachweis von Vimentin im Western-Blot-Verfahren vorgenommen. Vimentin ist ein Intermediärfilament und wird im Zytoplasma aller Zellen mesenchymaler Herkunft exprimiert. Dazu zählen beispielsweise glatte Muskelzellen, Gliazellen oder Endothelzellen. Epithelzellen wie auch Enterozyten exprimieren unter normalen Umständen kein Vimentin. Proben, die im Western Blot eine Vimentin-Bande aufwiesen, wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Die Kolonproben von Kontroll- und CU-Patienten waren auch bei sehr sorgfältiger Präparation oftmals Vimentin-positiv. Eine GDNF-Analyse der Kolon-Mukosa fand dennoch statt.



**Abbildung 29: Vimentin-Analyse von Ileum-Proben im Western Blot**

Die Abbildung zeigt beispielhaft die Vimentin-Expression der verwendeten Ileum-Proben. Während Vollwand-Lysate eine deutliche Vimentin-Bande bei 55 kDa zeigen, fehlt diese bei Mukosa-Lysaten vollständig. Als Positiv-Kontrolle wurden Lysate von EGC, als Negativ-Kontrolle Caco-2-Zellen aufgetragen.

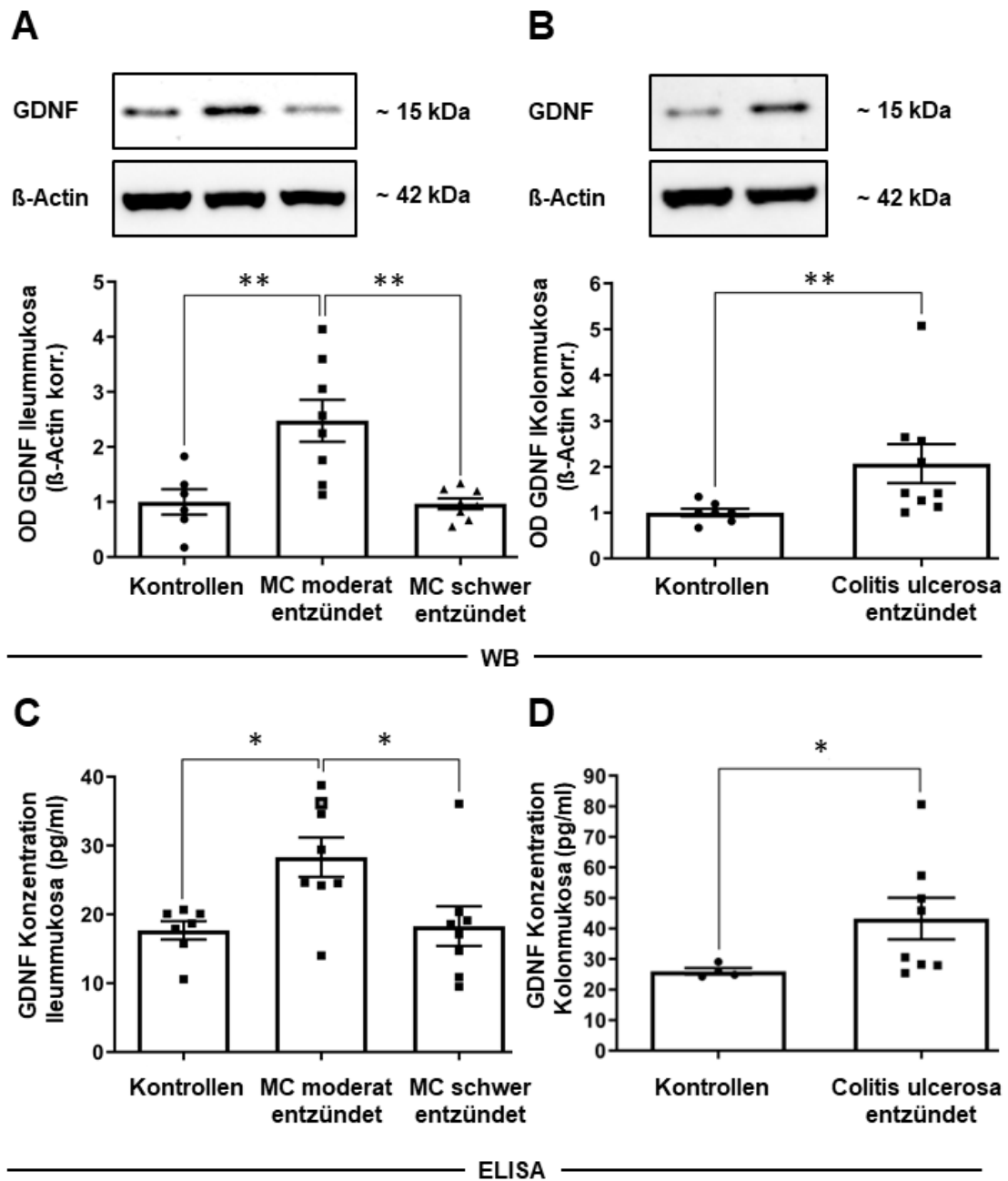
*Quelle: Eigene Darstellung*

Aus der darauffolgenden Western-Blot-Analyse der Mukosa-Proben aus dem terminalen Ileum ging eine um den Faktor 2,5 erhöhte Expression von GDNF in moderat endzündeten Abschnitten hervor (OD:  $2,48 \pm 0,39$ ). Die GDNF-Expression in Kontrollen (OD:

1,00 ± 0,39) und schwer entzündeten Abschnitten (OD: 0,97 ± 0,39) präsentierte sich hingegen annähernd gleich. Das GDNF-Signal der Mukosa in Proben von CU-Patienten (OD: 2,07 vs. 1,00 ± 0,49) war hingegen zweifach erhöht.

Der ergänzende ELISA-Assay konnte die Ergebnisse der Western-Blot-Untersuchung bestätigen. Die GDNF-Konzentration in moderat entzündeten Ileum-Abschnitten war um den Faktor 1,6 gegenüber Kontrollen (GDNF: 28,31 vs. 17,69 ± 3,67 pg/ml) und den Faktor 1,5 gegenüber schwer entzündeten Abschnitten [GDNF: 18,31 ± 3,54 (pg/ml)] statistisch signifikant erhöht. Auch die GDNF-Konzentration in der Mukosa von CU-Patienten war um den Faktor 1,7 gegenüber den Kontrollen erhöht [GDNF: 43,24 vs. 26,02 ± 9,87 (pg/ml)].

Zusammenfassend konnten anhand der Analyse der mukosalen GDNF-Expression die von von Boyen und Kollegen beschriebenen Tendenzen bestätigt werden, wenngleich sich deren Analyse auf Probiopsien aus dem Kolon beschränkte und die absoluten Zahlen in der ELISA-Messung differieren.



**Abbildung 30: GDNF-Expression der Mukosa bei CED im Western Blot und ELISA**

Die Proteinanalyse mittels Western Blot und ELISA der Mukosa von CED-Patienten zeigte eine gegenüber Kontrollen signifikant veränderte Expression von GDNF.

**A:** Die Mukosa moderat entzündeter Darmabschnitte des terminalen Ileums wies bei MC-Patienten eine höhere semiquantitative GDNF-Expression auf als in stark entzündeten Darmabschnitten und bei Kontrollpatienten (Statistische Tests: One-way-Anova und Shapiro-Wilk-Normalverteilungstest,  $**p < 0,01$  [Stichprobengröße: n (Kontrollen) = 6, n (MC) = 8]).

**B:** Die Western-Blot-Analyse der Kolon-Mukosa von Patienten mit aktiver Colitis Ulcerosa weist gegenüber Kontrollpatienten eine höhere GDNF-Expression auf. Statistische Tests: Mann-Whitney-Test und Shapiro-Wilk-Normalverteilungstest,  $**p < 0,01$ , [Stichprobengröße: n (Kontrollen) = 7, n (CU) = 9].

**C/D:** Ein durchgeführter ELISA-Assay konnte die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen quantitativ verifizieren (Statistische Tests: Für C: One-way-Anova und Shapiro-Wilk-Normalverteilungstest,  $*p <$

0,05, [Stichprobengröße: n (Kontrollen) = 7, n (MC) = 8]. Für D: Mann-Whitney und Shapiro-Wilk-Normalverteilungstest, \* $p < 0.05$  [Stichprobengröße: n (Kontrollen)= 4, n (CU) = 8].

*Quelle: Eigene Darstellung*



## **4. Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von EGC auf die Integrität der Darmbarriere untersucht. Im Fokus standen hierbei der neurotrophe Faktor GDNF sowie dessen Signaltransduktion über die Tyrosinkinase RET. Die etablierte humane Darmepithel-Zelllinie Caco2 wie auch eine murine EGC-Zelllinie (CRL 2690) wurden für In-vitro-Ko-Kultur-Experimente genutzt. Es erfolgte der Nachweis, dass die murine EGC-Zelllinie in physiologisch relevanten Dosen GDNF sezerniert. Zusätzlich wurden In-vivo-Daten von Patienten ausgewertet, um einen Zusammenhang zu CED herstellen zu können. Die Daten zeigen, dass EGC über GDNF die Differenzierung von Darmepithelzellen beschleunigten und gliales GDNF einer Zytokin-induzierten Destabilisierung der intestinalen Barrierefunktion im In-vitro-Modell entgegenwirkte. Erstmals konnte auch belegt werden, dass GDNF-assoziierte Effekte auf Enterozyten durch die Tyrosinkinase RET vermittelt werden. Die GDNF-Sekretion und Expression von EGC ließen sich zudem durch die Inkubation mit verschiedenen Zytokinen steigern. Die Analyse der GDNF-Expression aus Patientenproben konnte eine erhöhte mukosale Expression bei CED-Patienten bestätigen. Ein Novum stellt die detektierte transmurale Reduktion der GDNF-Expression bei CED-Patienten dar.

### **4.1 Optimierung der TEER-Messungen**

Die Daten der durchgeführten Messungen des TEER zeigen, dass die gemessenen Werte in den verwendeten Zelllinien nach einem konstanten Anstieg bis zum Erreichen der Konfluenz einen wellenförmigen Verlauf nehmen. Die mit FITC-Dextran registrierte Membrandurchlässigkeit nahm jedoch nach erreichter Konfluenz weiter stetig ab. Begründen lässt sich diese Diskrepanz damit, dass, obwohl beide Versuchsansätze prinzipiell zur Bewertung der intestinalen Barrierefunktion geeignet sind, sie jeweils von unterschiedlichen Transportmechanismen durch einen Zell-Monolayer abhängen. Während Messungen mit Marker-Molekülen wie FITC-Dextran gleichermaßen vom parazellulären Flux und von der Porengröße von Junctionsproteinen abhängig sind, werden TEER-Werte maßgeblich durch die Ionenleitfähigkeit des parazellulären Transportweges beeinflusst (Zucco et al. 2005). Aus ergänzenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die nicht

in der vorliegenden Arbeit enthalten sind, ging zudem hervor, dass der TEER eines konfluenten Zell-Monolayers in frühen Differenzierungsphasen maßgeblich durch die zunehmende Zellzahl und den damit einhergehenden Anstieg der gemessenen Junctionslängen bestimmt wird. Der Gesamt-TEER wird hierbei durch einen niedrigen Widerstand des parazellulären Weges im Vergleich zum transzellulären Weg dominiert. Dieser Effekt kehrt sich erst mit einer Stärkung der interzellulären Verbindungen im weiteren Differenzierungsprozess um (Kannapin et al. 2022).

Als Konsequenz aus diesen Beobachtungen wurden die TEER-Messungen im ECIS-Gerät bei der vorliegenden Dissertation ausschließlich bei subkonfluenten Zellen angewendet, um Unterschiede in der Barrierereifung darzustellen. Die Transwell-Messungen mit FITC-Dextran nach erfolgter Behandlung mit Zytokinen wurden hingegen an bereits konfluenten Zellen durchgeführt. Wie die gesammelten Daten zeigen, ist zwar die Barrierefunktion eines Zell-Monolayers zum Zeitpunkt der Konfluenz noch nicht fertig ausgeübt, das Stadium der Konfluenz stellt aber ein leicht und sicher zu reproduzierendes Kriterium der Reife eines Zell-Monolayers dar und wurde deswegen für die Permeabilitätsexperimente als Maßstab bzw. Startpunkt gewählt.

#### **4.2 Eine Ko-Kultur mit Caco-2-Zellen und CRL-2690-Zellen stellt ein geeignetes In-vitro-Modell zur Untersuchung der Barrierefunktion von Enterozyten dar.**

Das verwendete Zellmodell beinhaltet mit humanen Caco-2-Zellen eine für Barriere- und Permeabilitätsexperimente etablierte Zelllinie (Schlegel et al. 2010; Cheadle et al. 2013; Meir et al. 2015). Zwar wurden diese ursprünglich aus einem Kolonkarzinom gewonnen, allerdings ähneln Caco-2-Zellen in funktioneller sowie morphologischer Hinsicht sehr stark differenzierten Enterozyten nicht tumorösen Ursprungs (Sambuy et al. 2005). Die verwendeten EGC entstammten Rattenzellen, jedoch war für GDNF eine hohe speziesübergreifende Konservierung anzunehmen, da dieses eine elementare Rolle in der Ausbildung des enterischen Nervengeflechtes während der Embryonalphase von Säugern einnimmt (Cacalano, Farinas, et al. 1998; Hollander 2003; Lake and Heuckeroth 2013). Bereits publizierte Daten zeigen zudem, dass EGC speziesunabhängig ähnliche funktio-

nelle Eigenschaften auf die intestinale Barrierefunktion haben (Soret et al. 2013). Zusätzlich wurden ausschließlich humane GDNF-Antikörper für die Detektion bei Western-Blot- oder ELISA-Untersuchungen verwendet, was zusätzlich auf die hohe evolutionäre Konservierung des neurotrophen Faktors hinweist. Die für die GDNF-Signaltransduktion benötigten Rezeptoren konnten in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildete hierbei der GFR $\alpha$ 1-Rezeptor in den verwendeten EGC. Da sowohl Mäuse als auch Ratten diesen aber exprimieren (Chen et al. 2001; Ortega-de San Luis and Pascual 2016), könnte hierbei der für den Nachweis verwendete humane Antikörper zu einem falsch negativen Ergebnis beigetragen haben. Da die verwendeten EGC ohnehin nur als Donor von GDNF während der Ko-Kultur-Experimente dienten, konnte dieser Umstand aber für die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse vernachlässigt werden.

Ein erheblicher Anteil der durchgeführten Experimente wurde *in vitro* auf der Basis von Zellkulturlinien durchgeführt. Vor diesem Hintergrund muss natürlich diskutiert werden, inwieweit die gewonnenen Ergebnisse *in vivo* übertragbar sind. Grundsätzlich muss dazu angemerkt werden, dass ein *In-vitro*-Modell immer über gewisse Limitationen hinsichtlich der Aussagekraft von wissenschaftlichen Ergebnissen verfügt. Ein Modell kann die Komplexität von physiologischen Vorgängen nur begrenzt abbilden (Ghallab 2013). Gleichwohl ist es üblich, molekulare Mechanismen erst an Zellmodellen zu demonstrieren, bevor diese mit *In-vivo*-Experimenten getestet werden. Bei den verwendeten Zellkulturen handelte es sich um weltweit gut etablierte und charakterisierte Zelllinien und Untersuchungsmethoden. Die Relevanz der an diesen Zelllinien erhobenen Daten wird dadurch verdeutlicht, dass in von dieser Arbeit unabhängigen weiteren Versuchen unserer Arbeitsgruppe die barriestabilisierenden Eigenschaften von EGC bzw. GDNF mit Maus-Organoiden aus Darmepithelzellen reproduziert werden konnten (Meir et al. 2021). Organoiden bzw. in diesem Fall Enteroide werden aus pluripotenten Stammzellen generiert. Gegenüber einer primären Zellkultur im herkömmlichen Sinne haben diese aber den entscheidenden Vorteil, dass physiologische und pathophysiologische Eigenschaften ihres Ursprungsgewebes in einem größeren Maße erhalten bleiben (Yoo and Donowitz 2019). Die Reproduzierbarkeit in einem anderen *In-vitro*-Modell verstärkt die Aussagekraft der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Dennoch müssen entsprechende Validierungen in geeigneten *In-vivo*-Systemen in künftigen Arbeiten erfolgen.

### **4.3 Von enterischen Gliazellen sezerniertes GDNF beschleunigt die Reifung der Barrierefunktion von Enterozyten und stabilisiert diese während einer Inflammation.**

Es existieren bereits Daten aus In-vitro- und In-vivo-Experimenten, die einen Einfluss von GDNF auf die intestinale Barrierefunktion zeigten. Jedoch wurde in diesen Untersuchungen ausschließlich rGDNF verwendet. Dieses wurde Mäusen mit viralen Vektoren (Zhang et al. 2010; Xie et al. 2020) oder intraperitoneal (Meir et al. 2019) verabreicht. Der gemeinsame Nenner der genannten Publikationen ist, dass in Folge der GDNF-Intervention eine Abschwächung einer durch DSS-Applikation verursachten Colitis zu beobachten war. Eine Stimulation von Caco-2- und HT29B6-Zellen mit rGDNF bei In-vitro-Versuchsreihen zeigte eine schnellere Reifung von Zell-Zell-Kontakten und eine verbesserte Wundheilung von Epithelzellen (Meir et al. 2015). Obwohl in den gerade genannten Arbeiten EGC als wahrscheinlichste Quelle von GDNF im MDT postuliert wurden, gab es keine Verifizierung, dass diese auch tatsächlich über eine Sekretion von GDNF die intestinale Barrierefunktion beeinflussen. In In-vitro-Studien an Ko-Kulturmodellen konnte zwar die Wirkung anderer neurotropher Faktoren auf das Darmepithel nachvollzogen werden (Cheadle et al. 2013; Pochard et al. 2016), der entsprechende Nachweis wurde aber nicht für durch EGC sezerniertes GDNF geführt. Die vorliegende Arbeit wurde unter anderem konzipiert, um diese Informationslücke zu schließen.

In dieser Arbeit wurde herausgefunden, dass EGC über die Sekretion von GDNF zu einer schnelleren Reifung von Zell-Zell-Kontakten und damit einer verbesserten Barrierefunktion von Enterozyten beitragen. Die Effekte von rekombinant appliziertem GDNF waren mit denen von EGC-Überstand vergleichbar. In beiden Fällen konnten eine Erhöhung des TEER und eine Linearisierung der Zell-Zell-Kontakte bei subkonfluenten Zellen beobachtet werden. Wurde dem EGC-Überstand GDNF entzogen, schwächten sich die positiven Effekte auf die Barrierereifung der Enterozyten ab oder glichen sich gänzlich dem Kontrollniveau an. Hierbei war es unerheblich, ob das GDNF mittels Immunpräzipitation extrahiert wurde oder EGC mithilfe der CRISPR/Cas-Methode dahingehend manipuliert wurden, dass sie weniger GDNF exprimierten. Ähnliche Effekte zeigten sich auch im verwendeten Inflammationsmodell bei konfluenten Caco-2-Zellen. Die Applikation von TNF $\alpha$  führte zu einer Erhöhung des Permeabilitätskoeffizienten über den Zell-Monolayer

und einer Reorganisation der Junctionsproteine. Diese waren infolge der Zytokin-Behandlung nicht mehr stringent an den Zellgrenzen lokalisiert. In diesem Zusammenhang ist aber zu erwähnen, dass dies nur für Dsg2 und die untersuchten Claudine 1 und 5 galt. Die Lokalisation von E-Cadherin, als Vertreter der Adhärens-Kontakte, schien durch die Zytokin-Applikation weitestgehend unbeeinflusst. Diese Beobachtung wurde bereits in Mausmodellen nach DSS-induzierter Colitis vorweggenommen (Meir et al. 2019) und konnte somit nun auch *in vitro* bestätigt werden. Eine durch unsere Arbeitsgruppe zusätzlich durchgeführte quantitative Analyse der Zell-Zell-Kontakte auf Grundlage von Immunfärbungen, die nicht in der vorliegenden Arbeit enthalten ist, konnte die beobachteten Verteilungsmuster infolge der GDNF bzw. EGC-Intervention bestätigen (Meir et al. 2021).

Ein streitbarer Punkt an den geschilderten Beobachtungen ist die mit im Mittel 80 pg/ml gemessene GDNF-Konzentration im EGC-Überstand. Die gemessene Konzentration war zwar im Hinblick auf die gemessenen GDNF-Konzentrationen in humanen Darmproben plausibel und bestätigte aus anderen Studien vorliegende Sekretionsdaten (von Boyen et al. 2006; Hansebout et al. 2012), jedoch war die initial gewählte Konzentration für rGDNF (100 ng/ml) um den Faktor 1000 höher. Diese Konzentration wurde bewusst gewählt, da sie bereits in vorhergehenden Untersuchungen zur Stimulation von Epithelzellen angewandt wurde (Meir et al. 2015; Bergauer 2017). Um die Stringenz der Daten nicht zu gefährden, wurde die gewählte Konzentration für rGDNF beibehalten, auch nachdem eine Diskrepanz zu der im EGC-Überstand detektierten Konzentration zu beobachten war. In nachfolgenden Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe, die über die vorliegende Dissertation hinausreichten, wurde jedoch herausgefunden, dass eine Stimulation von Caco-2-Zellen mit rGDNF in einer Konzentration von 80 pg/ml ausreicht, um einen Effekt auf den Reifungsprozess der Epithelbarriere zu erzielen (Meir et al. 2021). Eine mögliche Erklärung hierfür liefern Untersuchungen, in denen eine maximale Stimulation von Retinazellen bei einer GDNF-Konzentration von 200 pg/ml festgestellt wurde. Darüber hinaus konnte keine zusätzliche Aktivierung erreicht werden (Jing et al. 1996). Da sowohl Retina- als auch Epithelzellen epithelialen Ursprungs sind, ist ein möglicher Ceiling-Effekt auch bei Epithelzellen sehr wahrscheinlich. GDNF-Konzentrationen im Pico-Gramm-Bereich scheinen bezogen auf Untersuchungen von humanem Darmgewebe eher den physiologischen Rahmenbedingungen zu entsprechen. Dies konnte durch über

diese Arbeit hinausgehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe auch an einem Maus- und primären Zellkulturmodell gezeigt werden (Meir et al. 2021). Schlussendlich bedeutet dies, dass die gewählte Konzentration für rGDNF ursprünglich zu hoch war, dies aber aufgrund eines wahrscheinlichen Ceiling-Effektes und einer nachgewiesenen Stimulation der Epithelzellen – auch bei niedrigeren Konzentrationen – nicht die Integrität der Ergebnisse gefährdete.

Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte eindeutig belegt werden, dass die beobachteten Effekte auf Enterozyten von GDNF abhängig waren. Da aber auch die Wirkung anderer neurotropher Faktoren auf die intestinale Barriere belegt sind, lässt sich an dieser Stelle nicht ausschließen, dass auch andere neurotrophe Faktoren wie GSNO oder 15-HETE einen Einfluss auf die Barrierereifung und Resilienz gegen inflammatorische Stimuli von Enterozyten haben (Cheadle et al. 2013; Pochard et al. 2016). Bezugnehmend auf Pochard et al., die Auswirkungen von 15-HETE auf die intestinale Barrierefunktion beschreiben, lässt sich argumentieren, dass bei deren Versuchsaufbau konditionierte Zellmedien verwendet wurden, um eine erhöhte Expression von 15-HETE in EGC zu induzieren (Pochard et al. 2016). Das von uns verwendete Standardkulturmedium DMEM hingegen enthält laut Herstellerangaben kein 15-HETE, was zu der Annahme führt, dass die vorhandene Menge des neurotrophen Faktors im verwendeten Versuchsaufbau vernachlässigbar ist. Synergien zwischen den verschiedenen bekannten neurotrophen Faktoren sind aber trotzdem denkbar, bzw. höchst wahrscheinlich. Beispielweise ist eine antiapoptotische Wirkung von GDNF auf EGC der Ratte nur in Verbindung mit BDNF (brain derived neurotrophic factor) beschrieben, wohingegen die alleinige Behandlung mit GDNF oder BDNF keine antiapoptotischen Effekte zeigte (Gundel 2008). Ähnliche Abhängigkeiten könnten auch bei Darmepithelzellen vorliegen. Diese These wird von einer Arbeit von Hagbom und Kollegen untermauert, die eine barriestabilisierende Wirkung sowohl für GDNF als auch GSNO im Zusammenhang mit einer Rotavirusinfektion und Experimenten an humanen sowie murinen Ex-vivo-Modellen (Ussing chamber) aufzeigen konnten (Hagbom et al. 2020). Es war aber nicht das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Wirkung von glialem GDNF im Kontext anderer neurotropher Faktoren zu beurteilen.

Die Zusammenschau der geschilderten Ergebnisse stützt die Hypothese, dass von EGC sezerniertes GDNF einen der Hauptmediatoren im Zusammenspiel zwischen EGC und

Darmepithelzellen darstellt. Die GDNF-Sekretion von EGC schützt während einer Inflammation die Barrierefunktion von Enterozyten und führt bei subkonfluenten Enterozyten zu einer schnelleren Ausreifung der intestinalen Barriere.

#### **4.4 Die GDNF-Effekte auf Enterozyten werden über den RET-Rezeptor vermittelt.**

Der Mechanismus der Signaltransduktion von GDNF über den RET-Rezeptor wurde im Zusammenhang mit Neuronen und EGC bereits intensiv beforscht (Kramer and Liss 2015; Kearon et al. 2021). Nach der für die vorliegende Arbeit ausgewerteten Literatur existiert aber keine Analyse, die die Relevanz dieses Signalweges auch für Enterozyten aufzeigt. In den meisten Publikationen bezüglich GDNF und intestinaler Barrierefunktion wurde davon ausgegangen, dass hierbei die Signaltransduktion auf bekannte Weise erfolgt, weil Enterozyten unter anderem die hierfür benötigten Rezeptoren exprimieren. Ein Nachweis wurde gleichwohl nicht geführt (Steinkamp et al. 2003; Xiao et al. 2014; Meir et al. 2015). Mit dieser Arbeit wurde dieses fehlende Wissen ergänzt. Zwei Versuchsansätze wurden hierzu verwendet, nämlich die Expressionshemmung des RET-Rezeptors in Caco-2-Zellen mittels siRNA und die Inhibition der Signaltransduktion mithilfe eines spezifischen RET-Inhibitors. Beide Ansätze lieferten ähnliche Ergebnisse und zeigten, dass die GDNF-vermittelte Barriere-Reifung von Enterozyten und die Resilienz gegen Zytokine maßgeblich von der Signaltransduktion über den RET-Rezeptor vermittelt wurden. Im Gegensatz dazu war die Phosphorylierung von RET an den Tyrosinresten 905 und 1062 nach einer GDNF-Behandlung zwar erhöht, verfehlte aber das Signifikanzniveau gegenüber unbehandelten Kontrollen. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür sind die Autophosphorylierungsfunktion von RET oder eine nicht ausreichende Stichprobengröße. Autophosphorylierungskaskaden laufen mit einer hohen Geschwindigkeit ab und ein Phosphorylierungsnachweis durch eine Western-Blot-Untersuchung ermöglicht hierbei immer nur eine Momentaufnahme. Daher wurde die erfolgreiche Inhibition der RET-Phosphorylierung in Verbindung mit den vorliegenden Ergebnissen als ein ausreichender Nachweis für die Wirkungsbeziehung zwischen GDNF und dem RET-Rezeptor erachtet – zumal die Auswertung erster klinischer Daten des verwendeten RET-Inhibitors in der Behandlung von Schilddrüsenkarzinomen das überproportional häufige Auftreten von gastrointestinalen Nebenwirkungen zeigte (Mulligan 2019; Taylor et al. 2019). Radiologisch zeigten sich bei den mit RET-Inhibitoren behandelten Patienten Veränderungen die

mit gastrointestinalen Inflammationsprozessen vereinbar sind. Histologische Untersuchungen deuteten auf die Entwicklung eines Mukosa-Ödems hin (Tsang et al. 2022). Nach derzeitigem Kenntnisstand fußen die von GDNF auf Epithelzellen vermittelten Effekte auf einer Blockade des p38-MAPK-Signalwegs (Meir et al. 2015; Xiao et al. 2017). Übereinstimmend damit zeigten die verwendeten Caco-2-Zellen nach der Transfektion mit RET-siRNA keine GDNF-vermittelte Inhibition des p38-MAPK-Pfades mehr auf. Zusätzlich war eine tendenziell vermehrte Phosphorylierung der p38-MAPK nach RET-siRNA-Transfektion gegenüber der NT-siRNA auffällig. Auch wenn der Unterschied statistisch nicht signifikant war, könnte er auf einen erhöhten Zellstress der Epithelzellen aufgrund der Abwesenheit des RET-Rezeptors hinweisen.

Zusammenfassend weisen die dargelegten Ergebnisse darauf hin, dass die GDNF-Signaltransduktion auch in Darmepithelzellen über den RET-Rezeptor in Verbindung mit der p38 MAPK vermittelt wird.

#### **4.5 EGC sind eine der wichtigsten GDNF-Quellen im Intestinum und könnten eine erhebliche Rolle in der Pathogenese von CED einnehmen.**

Diese Arbeit fußt auf der Hypothese, dass EGC eine der größten Quellen des neurotrophen Faktors GDNF im Intestinum sind. Für diese Annahme spricht, dass für EGC sowohl in dieser Arbeit als auch in anderen Publikationen eine Sekretion des neurotrophen Faktors in ausreichenden Konzentrationen nachgewiesen wurde (von Boyen et al. 2004; Hansebout et al. 2012). Zwar sezernieren auch Enterozyten GDNF (Meir et al. 2015), eine durchgeführte ELISA-Messung reiner Mukosa-Biopsate konnte aber nur eine weit aus niedrigere GDNF-Konzentration als in den korrespondierenden Vollwandproben detektieren. Wird zudem bedacht, dass Mukosa-Biopsien fast ausschließlich aus Enterozyten, Vollwandproben jedoch aus einer Vielzahl von Gewebetypen bestehen, scheiden Enterozyten als Hauptquelle des intestinalen GDNF aus. Dies wird auch dadurch gestützt, dass im verwendeten Ko-Kultur-Modell die autokrine GDNF-Sekretion von Enterozyten nicht ausreichte, um die Effekte einer GDNF-Reduktion im EGC-Überstand auszugleichen. In der Literatur werden als weitere GDNF-Quelle noch glatte Muskelzellen der



Darmwand genannt (Han et al. 2015; Brun et al. 2015). Der relative Beitrag des aus glatten Muskelzellen stammenden GDNF lässt sich derzeit allerdings schwer abschätzen. Gleichwohl könnten diese als zusätzliche GDNF-Quelle dazu in der Lage sein, die intestinale Homöostase bei einer verringerten GDNF-Sekretion von EGC aufrechtzuerhalten.

In mehreren wissenschaftlichen Publikationen der letzten 20 Jahre konnte die Bedeutung von neurotrophen Faktoren (Cheadle et al. 2013; Pochard et al. 2016) und im Besonderen von GDNF für die intestinale Barrierefunktion dargelegt werden (Zhang et al. 2010; Meir et al. 2015; Meir et al. 2019; Xie et al. 2020). Jedoch fehlte bislang der Nachweis einer direkten Verbindung zwischen einer GDNF-Sekretion aus EGC und einer daraus resultierenden Veränderung der Barriereeigenschaften von Enterozyten. Die vorliegende Arbeit ergänzt an diesem Punkt die bereits vorhandenen Erkenntnisse.

Im Hinblick auf die Involvierung von EGC in den Pathomechanismus von CED ist die Datenlage widersprüchlich. Während sich bei einigen Untersuchungen die intestinale Barrierefunktion nach der Ablation von EGC signifikant verschlechterte und eine Entzündung des Darmgewebes auftrat (Bush et al. 1998; Aube et al. 2006; Savidge et al. 2007), konnten in anderen Studien hingegen keine messbaren akuten Effekte auf die Darmbarriere durch die Absenz von EGC festgestellt werden (Rao et al. 2017; Grubišić and Gulbransen 2017). Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch ist neben der bereits erwähnten kompensatorischen Wirkung von anderen Zelltypen wie glatten Muskelzellen die komplexe Pathogenese der CED, die sich anhand von Modellen nur schwer abbilden lässt. Mehrere Faktoren tragen zur Entwicklung und zum Unterhalt des inflammatorischen Milieus bei. So spielen neben einer veränderten intestinalen Permeabilität (Michielan and D'Inca 2015) auch die Genetik, das Mikrobiom, Umwelteinflüsse und eine veränderte Immunantwort eine Rolle (Zhang and Li 2014). Welchen Anteil die jeweiligen Faktoren jedoch an der CED-Pathogenese haben, lässt sich nicht pauschal beantworten. Denkbar ist, dass sich nur durch das gleichzeitige Auftreten mehrerer Faktoren Erkrankungsschübe oder messbare Auswirkungen auf die intestinale Permeabilität ergeben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen aber nahe, dass möglicherweise die GDNF-Sekretion von EGC einen Anteil an der Pathogenese von CED hat. Durch die schon dargelegten Limitationen des In-vitro-Versuchsansatzes könnte diese Frage aller-

dings nur durch die Verwendung eines fortschrittlichen In-vivo-Modells beantwortet werden. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang eine medikamentös induzierbare Herunterregulation von GDNF in enterischen Gliazellen im Mausmodell.

#### **4.6 CED-Patienten zeigen Veränderungen der GDNF-Expression im Darm.**

Patienten, die an einer CED leiden, weisen unterschiedliche strukturelle Veränderungen im MDT auf. So wurden beispielsweise Veränderungen in der Expression von Junctionalproteinen (Landy et al. 2016) beschrieben. Interessant ist die Tatsache, dass Veränderungen der Junctionalproteine auch bei humanen Organoiden von CED-Patienten Bestand haben, was auf eine Konservierung der Alterationen auf Stammzellniveau hinweist (d'Aldebert et al. 2020; Meir et al. 2020). Daneben wird dem enterischen Nervensystem eine mögliche Schlüsselrolle in der Pathogenese der CED zugestanden, da unter anderem isomorphe Veränderungen des enterischen Nervengeflechtes dokumentiert sind (Pochard et al. 2018). So wurde in Untersuchungen an MC-Patienten eine verminderte Anzahl an EGC mit einer reduzierten GDNF-Expression festgestellt. Gleichzeitig war jedoch die mukosale Expression von GDNF in entzündeten Biopsaten erhöht (von Boyen et al. 2011).

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem enterischen Nervensystem und CED zu detektieren, wurde die Reaktion von kultivierten EGC auf inflammatorische Reize evaluiert. Zusätzlich erfolgten bei Vollwand- und Mukosa-Biopsien von CED-Patienten eine semiquantitative sowie quantitative GDNF-Analyse. In den mit Zytokinen behandelten EGC ließen sich sowohl die Expression als auch die Sekretion von GDNF durch die Behandlung steigern. Dies steht im Einklang mit bereits publizierten Daten (von Boyen et al. 2004) und festigt die Hypothese, dass EGC bzw. GDNF möglicherweise einen Anteil an der Pathogenese der beiden Krankheitsbilder haben. Die Analyse der GDNF-Konzentration in Patientenproben hatte zwei unterschiedliche Ergebnisse. In reinen Mukosa-Biopsien konnte in Proben aus moderat entzündeten Darmabschnitten von MC-Patienten eine Erhöhung der GDNF-Expression festgestellt werden. Stark entzündete Abschnitte wiesen hingegen keine signifikanten Veränderungen gegenüber den Kontrollpatienten auf. Ebenfalls war die GDNF-Expression in entzündeten Abschnitten der Mukosa von

CU-Patienten erhöht. Jedoch wurde in der Analyse der Vollwandlysate in den stark entzündeten Abschnitten von MC-Patienten eine erniedrigte GDNF-Konzentration festgestellt. In gleicher Weise war die GDNF-Expression in entzündetem Vollwandgewebe von CU-Patienten vermindert. Um diesen scheinbaren Widerspruch zu erklären, muss die am Anfang dieses Abschnitts zitierte Arbeit von von Boyen und Kollegen aus dem Jahre 2011 hinzugezogen werden. In deren Analyse von Mukosa-Biopsien wurde nicht zwischen verschiedenen Entzündungsstadien unterschieden und es wurde eine Erhöhung der mukosalen GDNF-Expression bei beiden CED-Entitäten festgestellt, was grundsätzlich unseren Ergebnissen der Mukosa-Analyse von moderat entzündeten Gewebeproben entspricht. Die erhöhte GDNF-Expression der Mukosa deuteten von Boyen und Kollegen als eine unspezifische Reaktion auf inflammatorische Reize, da diese beispielweise auch bei einer Infektion mit *Clostridium difficile* auftrat. In der gleichen Arbeit wurde aber auch eine reduzierte EGC-Population bei MC-Patienten beschrieben. Diese ging mit einer verminderten GDNF-Expression einher und wurde immunhistochemisch verifiziert. Unsere Ergebnisse stützen diese Hypothese. Die in moderat entzündeten Darmabschnitten von MC-Patienten festgestellte Erhöhung der GDNF-Expression kann als ein Rettungsmechanismus der Mukosa infolge der Inflammation interpretiert werden. Hierbei könnte die vermehrte Expression sowohl durch EGC des Plexus submukosus als auch Enterozyten bedingt sein. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung untermauert, dass im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion eine Aktivierung von EGC, vornehmlich im Plexus submukosus, durch eine erhöhte Expression von GFAP, S100 $\beta$  oder GDNF vorliegt (Villanacci et al. 2008; Steinkamp et al. 2012; Esposito et al. 2014). Die Tatsache, dass in schwer entzündeten Darmabschnitten der Patienten keine GDNF-Erhöhung mehr nachweisbar war, könnte Ausdruck dessen sein, dass dieser Mechanismus irgendwann erschöpft ist. Die in schwer entzündeten Vollwandproben registrierte verminderte Expression des neurotrophen Faktors verifiziert indirekt die von der Arbeitsgruppe um von Boyen beobachtete Degeneration der EGC und steht im Einklang mit histochemischen Untersuchungen, in denen eine Reduktion von GFAP oder S100 $\beta$ -positiven Zellen bei Patienten mit einer CED im Plexus myentericus festgestellt werden konnte (Cornet et al. 2001; Villanacci et al. 2008; von Boyen et al. 2011; Bernardini et al. 2012). Dass sich die GDNF-Expression in Vollwandproben von MC-Patienten mit einem moderaten Inflammations-Score nicht signifikant von den Kontrollen unterschied, deutet überdies darauf

hin, dass ein strukturelles Defizit der EGC im Anfangsstadium einer CED durch eine Hochregulation der GDNF-Ausschüttung auf mukosalem Niveau oder durch andere Zelltypen kompensiert wird.

## 5. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Dissertation wurde das Zusammenspiel von enterischen Gliazellen (EGC) und Darmepithelzellen (Caco-2) thematisiert, wobei der Fokus auf der Bedeutung des neurotrophen Faktors GDNF für die Interaktion zwischen den beiden genannten Zelltypen lag. Weiterhin wurde evaluiert, ob die Tyrosinkinase RET auch in Darmepithelzellen für die GDNF-Signaltransduktion unter Ruhebedingungen und bei Entzündungen verantwortlich ist.

Als Grundlage diente ein Ko-Kultur-Modell mit Caco-2 und EGC. Durch Permeabilitäts- und Widerstandsmessungen wurden die Auswirkungen von GDNF auf Zell-Monolayer ermittelt. Effekte auf die Barriredifferenzierung wurden anhand subkonfluenten Zell-Monolayer charakterisiert, wohingegen die Auswirkungen auf Entzündungsstimuli an konfluenten Zellen untersucht wurden. Veränderungen von Junctionsproteinen wurden mit Immunfluoreszenzfärbungen und Western-Blot-Analysen aufgezeigt. Abschließend erfolgte eine Analyse humaner Gewebeproben von Patienten mit und ohne chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) in Bezug auf deren GDNF-Expression.

Die verwendeten intestinalen Epithelzellen exprimieren die GDNF-Rezeptoren GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2, GFR $\alpha$ 3 und RET. Nach Etablierung des Kultursystems zeigten Permeabilitätsmessungen, Messungen des Epithelwiderstandes sowie Immunfluoreszenz-Färbungen, dass die Differenzierung der Darmepithelzellen in der Ko-Kultur mit EGC durch GDNF vermittelt wird. Zudem war eine GDNF-abhängige, barrirestabilisierende Wirkung in einem Inflammationsmodell zu beobachten. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass GDNF-Effekte auf Enterozyten auch im Darmepithel über die RET-Tyrosinkinase mit nachfolgender Hemmung des p38-MAPK-Signalwegs bedingt werden. Eine Stimulation der EGC mit Zytokinen bestätigte eine Hochregulation der GDNF-Expression und Sekretion. In humanen Proben war intestinales GDNF bei schwerer Entzündung reduziert.

Zusammenfassend wurde erstmalig der Nachweis erbracht, dass von EGC sezerniertes GDNF die Differenzierung der Barriere in Darmepithelzellen induziert und diese gegen einen Zytokin-vermittelten Zusammenbruch schützt. Dies wird über eine RET-abhängige Regulation der p38-MAPK vermittelt. Die Reduktion der GDNF-Konzentration in transmuralen Gewebeproben von Patienten mit CED trägt möglicherweise zur Pathogenese der CED bei.

## 6. Literaturverzeichnis:

- Abraham, C., and J. H. Cho. 2009. 'Inflammatory bowel disease', *N Engl J Med*, 361: 2066-78.
- Airaksinen, M. S., and M. Saarma. 2002. 'The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value', *Nat Rev Neurosci*, 3: 383-94.
- Al-Sadi, R., D. Ye, K. Dokladny, and T. Y. Ma. 2008. 'Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability', *J Immunol*, 180: 5653-61.
- Ananthakrishnan, A. N., C. N. Bernstein, D. Iliopoulos, A. Macpherson, M. F. Neurath, R. A. R. Ali, S. R. Vavricka, and C. Fiocchi. 2018. 'Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 15: 39-49.
- Aube, A. C., J. Cabarrocas, J. Bauer, D. Philippe, P. Aubert, F. Doulay, R. Liblau, J. P. Galmiche, and M. Neunlist. 2006. 'Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption', *Gut*, 55: 630-7.
- Bank, S., P. S. Andersen, J. Burisch, N. Pedersen, S. Roug, J. Galsgaard, S. Y. Turino, J. B. Brodersen, S. Rashid, S. Avlund, T. B. Olesen, A. Green, H. J. Hoffmann, M. K. Thomsen, V. O. Thomsen, B. A. Nexø, U. Vogel, and V. Andersen. 2015. 'Effectiveness of anti-tumour necrosis factor-alpha therapy in Danish patients with inflammatory bowel diseases', *Dan Med J*, 62.
- Bankaitis, E. D., A. Ha, C. J. Kuo, and S. T. Magness. 2018. 'Reserve Stem Cells in Intestinal Homeostasis and Injury', *Gastroenterology*, 155: 1348-61.
- Barko, P. C., M. A. McMichael, K. S. Swanson, and D. A. Williams. 2018. 'The Gastrointestinal Microbiome: A Review', *J Vet Intern Med*, 32: 9-25.
- Benninghoff, Alfred, Detlev Drenckhahn, and Jens Waschke. 2008. *Taschenbuch anatomie* (Elsevier, Urban & Fischer München).
- Bergauer, Lisa. 2017. 'Die Bedeutung des neurotrophen Faktors Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) für die Integrität der intestinalen Epithelbarriere'.
- Bernardini, N., C. Segnani, C. Ippolito, R. De Giorgio, R. Colucci, M. S. Fausone-Pellegrini, M. Chiarugi, D. Campani, M. Castagna, L. Mattii, C. Blandizzi, and A. Dolfi. 2012. 'Immunohistochemical analysis of myenteric ganglia and interstitial cells of Cajal in ulcerative colitis', *J Cell Mol Med*, 16: 318-27.
- Bespalov, M. M., Y. A. Sidorova, S. Tumova, A. Ahonen-Bishopp, A. C. Magalhaes, E. Kuleskiy, M. Paveliev, C. Rivera, H. Rauvala, and M. Saarma. 2011. 'Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin', *J Cell Biol*, 192: 153-69.
- Bradford, E. M., S. H. Ryu, A. P. Singh, G. Lee, T. Goretsky, P. Sinh, D. B. Williams, A. L. Cloud, E. Gounaris, V. Patel, O. F. Lamping, E. B. Lynch, M. P. Moyer, I. G. De Plaen, D. J. Shealy, G. Y. Yang, and T. A. Barrett. 2017. 'Epithelial TNF

- Receptor Signaling Promotes Mucosal Repair in Inflammatory Bowel Disease', *J Immunol*, 199: 1886-97.
- Brown, I. A. M., and B. D. Gulbransen. 2018. 'The antioxidant glutathione protects against enteric neuron death in situ, but its depletion is protective during colitis', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 314: G39-g52.
- Brown, I. A., J. L. McClain, R. E. Watson, B. A. Patel, and B. D. Gulbransen. 2016. 'Enteric glia mediate neuron death in colitis through purinergic pathways that require connexin-43 and nitric oxide', *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2: 77-91.
- Brun, P., S. Gobbo, V. Caputi, L. Spagnol, G. Schirato, M. Pasqualin, E. Levorato, G. Palu, M. C. Giron, and I. Castagliuolo. 2015. 'Toll like receptor-2 regulates production of glial-derived neurotrophic factors in murine intestinal smooth muscle cells', *Mol Cell Neurosci*, 68: 24-35.
- Bush, T. G., T. C. Savidge, T. C. Freeman, H. J. Cox, E. A. Campbell, L. Mucke, M. H. Johnson, and M. V. Sofroniew. 1998. 'Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice', *Cell*, 93: 189-201.
- Cabarrocas, J., T. C. Savidge, and R. S. Liblau. 2003. 'Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease', *Glia*, 41: 81-93.
- Cacalano, G., I. Farinas, L. C. Wang, K. Hagler, A. Forgie, M. Moore, M. Armanini, H. Phillips, A. M. Ryan, L. F. Reichardt, M. Hynes, A. Davies, and A. Rosenthal. 1998. 'GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney', *Neuron*, 21: 53-62.
- Cacalano, G., I. Fariñas, L. C. Wang, K. Hagler, A. Forgie, M. Moore, M. Armanini, H. Phillips, A. M. Ryan, L. F. Reichardt, M. Hynes, A. Davies, and A. Rosenthal. 1998. 'GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney', *Neuron*, 21: 53-62.
- Campbell, Hannah K., Jessica L. Maiers, and Kris A. DeMali. 2017. 'Interplay between tight junctions & adherens junctions', *Experimental cell research*, 358: 39-44.
- Chandrasekharan, B., S. Jeppsson, S. Pienkowski, D. D. Belsham, S. V. Sitaraman, D. Merlin, E. Kokkotou, A. Nusrat, M. G. Tansey, and S. Srinivasan. 2013. 'Tumor necrosis factor-neuropeptide Y cross talk regulates inflammation, epithelial barrier functions, and colonic motility', *Inflamm Bowel Dis*, 19: 2535-46.
- Chang, J., R. W. Leong, V. C. Wasinger, M. Ip, M. Yang, and T. G. Phan. 2017. 'Impaired Intestinal Permeability Contributes to Ongoing Bowel Symptoms in Patients With Inflammatory Bowel Disease and Mucosal Healing', *Gastroenterology*, 153: 723-31.e1.
- Cheadle, G. A., T. W. Costantini, N. Lopez, V. Bansal, B. P. Eliceiri, and R. Coimbra. 2013. 'Enteric glia cells attenuate cytomix-induced intestinal epithelial barrier breakdown', *PLoS One*, 8: e69042.
- Chen, A. C., A. J. Eisch, N. Sakai, M. Takahashi, E. J. Nestler, and R. S. Duman. 2001. 'Regulation of GFRalpha-1 and GFRalpha-2 mRNAs in rat brain by electroconvulsive seizure', *Synapse*, 39: 42-50.

- Chow, A. K., and B. D. Gulbransen. 2017. 'Potential roles of enteric glia in bridging neuroimmune communication in the gut', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 312: G145-g52.
- Clayburgh, Daniel R., Terrence A. Barrett, Yueming Tang, Jon B. Meddings, Linda J. Van Eldik, D. Martin Watterson, Lane L. Clarke, Randall J. Mrsny, and Jerrold R. Turner. 2005. 'Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo', *The Journal of clinical investigation*, 115: 2702-15.
- Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, and F. Zhang. 2013. 'Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems', *Science*, 339: 819-23.
- Cornet, A., T. C. Savidge, J. Cabarocas, W. L. Deng, J. F. Colombel, H. Lassmann, P. Desreumaux, and R. S. Liblau. 2001. 'Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease?', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 13306-11.
- d'Aldebert, Emilie, Muriel Quaranta, Morgane Sébert, Delphine Bonnet, Sylvain Kirzin, Guillaume Portier, Jean-Pierre Duffas, Sophie Chabot, Philippe Lluel, Sophie Allart, Audrey Ferrand, Laurent Alric, Claire Racaud-Sultan, Emmanuel Mas, Céline Deraison, and Nathalie Vergnolle. 2020. 'Characterization of Human Colon Organoids From Inflammatory Bowel Disease Patients', *Frontiers in cell and developmental biology*, 8: 363-63.
- d'Anglemont de Tassigny, Xavier, Alberto Pascual, and José López-Barneo. 2015. 'GDNF-based therapies, GDNF-producing interneurons, and trophic support of the dopaminergic nigrostriatal pathway. Implications for Parkinson's disease', *Frontiers in neuroanatomy*, 9: 10-10.
- da Silveira, A. B., E. C. de Oliveira, S. G. Neto, A. O. Luquetti, R. T. Fujiwara, R. C. Oliveira, and A. Brehmer. 2011. 'Enteroglial cells act as antigen-presenting cells in chagasic megacolon', *Hum Pathol*, 42: 522-32.
- Deplancke, B., and H. R. Gaskins. 2001. 'Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer', *Am J Clin Nutr*, 73: 1131s-41s.
- Doudna, Jennifer A, and Emmanuelle Charpentier. 2014. 'The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9', *Science*, 346: 1258096.
- Duarte Azevedo, M., S. Sander, and L. Tenenbaum. 2020. 'GDNF, A Neuron-Derived Factor Upregulated in Glial Cells during Disease', *J Clin Med*, 9.
- Dubeau, M. F., M. Iacucci, P. L. Beck, G. W. Moran, G. G. Kaplan, S. Ghosh, and R. Panaccione. 2013. 'Drug-induced inflammatory bowel disease and IBD-like conditions', *Inflamm Bowel Dis*, 19: 445-56.
- Edelblum, K. L., and J. R. Turner. 2009. 'The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown', *Curr Opin Pharmacol*, 9: 715-20.
- Engvall, Eva, and P Perlmann. 1971. 'Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)', *Protides of the biological fluids*: 553-56.
- Esposito, G., E. Capoccia, F. Turco, I. Palumbo, J. Lu, A. Steardo, R. Cuomo, G. Sarnelli, and L. Steardo. 2014. 'Palmitoylethanolamide improves colon



- inflammation through an enteric glia/toll like receptor 4-dependent PPAR- $\alpha$  activation', *Gut*, 63: 1300-12.
- Farquhar, M. G., and G. E. Palade. 1963. 'Junctional complexes in various epithelia', *J Cell Biol*, 17: 375-412.
- Flemming, S., N. Burkard, M. Renschler, F. Vielmuth, M. Meir, M. A. Schick, C. Wunder, C. T. Germer, V. Spindler, J. Waschke, and N. Schlegel. 2015. 'Soluble VE-cadherin is involved in endothelial barrier breakdown in systemic inflammation and sepsis', *Cardiovasc Res*, 107: 32-44.
- Flemming, S., A. C. Luissint, D. H. M. Kusters, A. Raya-Sandino, S. Fan, D. W. Zhou, M. Hasegawa, V. Garcia-Hernandez, A. J. Garcia, C. Parkos, and A. Nusrat. 2020. 'Desmocollin-2 promotes intestinal mucosal repair by controlling integrin-dependent cell adhesion and migration', *Mol Biol Cell*: mbcE19120692.
- Frosali, S., D. Pagliari, G. Gambassi, R. Landolfi, F. Pandolfi, and R. Cianci. 2015. 'How the Intricate Interaction among Toll-Like Receptors, Microbiota, and Intestinal Immunity Can Influence Gastrointestinal Pathology', *J Immunol Res*, 2015: 489821.
- Funahashi, H., Y. Okada, H. Sawai, H. Takahashi, Y. Matsuo, H. Takeyama, and T. Manabe. 2005. 'The role of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and integrins for invasion and metastasis in human pancreatic cancer cells', *J Surg Oncol*, 91: 77-83.
- Furness, J. B. 2000. 'Types of neurons in the enteric nervous system', *J Auton Nerv Syst*, 81: 87-96.
- Furness, J. B., B. P. Callaghan, L. R. Rivera, and H. J. Cho. 2014. 'The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control', *Adv Exp Med Biol*, 817: 39-71.
- Garcia-Hernandez, V., M. Quiros, and A. Nusrat. 2017. 'Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation', *Ann N Y Acad Sci*, 1397: 66-79.
- Garnis, C., J. J. Davies, T. P. Buys, M. S. Tsao, C. MacAulay, S. Lam, and W. L. Lam. 2005. 'Chromosome 5p aberrations are early events in lung cancer: implication of glial cell line-derived neurotrophic factor in disease progression', *Oncogene*, 24: 4806-12.
- Geboes, K., P. Rutgeerts, N. Ectors, J. Mebis, F. Penninckx, G. Vantrappen, and V. J. Desmet. 1992. 'Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease', *Gastroenterology*, 103: 439-47.
- Geremia, A., P. Biancheri, P. Allan, G. R. Corazza, and A. Di Sabatino. 2014. 'Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease', *Autoimmun Rev*, 13: 3-10.
- Getsios, S., A. C. Huen, and K. J. Green. 2004. 'Working out the strength and flexibility of desmosomes', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 271-81.
- Ghallab, Ahmed. 2013. 'In vitro test systems and their limitations', *EXCLI journal*, 12: 1024-26.

- Groschwitz, Katherine R., and Simon P. Hogan. 2009. 'Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis', *The Journal of allergy and clinical immunology*, 124: 3-22.
- Gross, A., L. A. P. Pack, G. M. Schacht, S. Kant, H. Ungewiss, M. Meir, N. Schlegel, C. Preisinger, P. Boor, N. Guldiken, C. A. Krusche, G. Sellge, C. Trautwein, J. Waschke, A. Heuser, R. E. Leube, and P. Strnad. 2018. 'Desmoglein 2, but not desmocollin 2, protects intestinal epithelia from injury', *Mucosal Immunol*, 11: 1630-39.
- Grubišić, V., and B. D. Gulbransen. 2017. 'Enteric glial activity regulates secretomotor function in the mouse colon but does not acutely affect gut permeability', *J Physiol*, 595: 3409-24.
- Gulbransen, BD. 2014. 'Enteric Glia: Colloquium Series on Neuroglia in Biology and Medicine from Physiology to Disease', *Morgan and Claypool Life Sciences ebook*
- Gundel, Heike. 2008. 'Der Einfluss von Neurotrophen und neurotrophen Faktoren auf die Apoptose-Modulation in primärer enterischer Glia der Ratte', Universität Ulm.
- Hagbom, M., F. M. De Faria, M. E. Winberg, S. Westerberg, J. Nordgren, S. Sharma, V. Keita Å, V. Loitto, K. E. Magnusson, and L. Svensson. 2020. 'Neurotrophic Factors Protect the Intestinal Barrier from Rotavirus Insult in Mice', *mBio*, 11.
- Hamilton, Andrew J, and David C Baulcombe. 1999. 'A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants', *Science*, 286: 950-52.
- Han, T. Y., S. Lourenssen, K. G. Miller, and M. G. Blennerhassett. 2015. 'Intestinal smooth muscle phenotype determines enteric neuronal survival via GDNF expression', *Neuroscience*, 290: 357-68.
- Hansebout, C. R., C. Su, K. Reddy, D. Zhang, C. Jiang, M. P. Rathbone, and S. Jiang. 2012. 'Enteric glia mediate neuronal outgrowth through release of neurotrophic factors', *Neural Regen Res*, 7: 2165-75.
- Hansen, M. B. 2003. 'The enteric nervous system I: organisation and classification', *Pharmacol Toxicol*, 92: 105-13.
- Hartlieb, E., V. Rötzer, M. Radeva, V. Spindler, and J. Waschke. 2014. 'Desmoglein 2 compensates for desmoglein 3 but does not control cell adhesion via regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in keratinocytes', *J Biol Chem*, 289: 17043-53.
- Hehlgans, T., and K. Pfeffer. 2005. 'The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games', *Immunology*, 115: 1-20.
- Helander, H. F., and L. Fandriks. 2014. 'Surface area of the digestive tract - revisited', *Scand J Gastroenterol*, 49: 681-9.
- Heuckeroth, R. O., P. A. Lampe, E. M. Johnson, and J. Milbrandt. 1998. 'Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors in vitro', *Dev Biol*, 200: 116-29.

- Hoffmann, Jörg C., Anton J. Kroesen, and Bodo Klump. 2004. "Chronisch entzündliche Darmerkrankungen." In *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen*, edited by Jörg C. Hoffmann, Anton J. Kroesen and Bodo Klump. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Hollander, D. 1999. 'Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders', *Curr Gastroenterol Rep*, 1: 410-6.
- . 2002. 'Crohn's disease, TNF-alpha, and the leaky gut. The chicken or the egg?', *Am J Gastroenterol*, 97: 1867-8.
- . 2003. 'Inflammatory bowel diseases and brain-gut axis', *J Physiol Pharmacol*, 54 Suppl 4: 183-90.
- Huang, X. Z., Z. R. Li, L. B. Zhu, H. Y. Huang, L. L. Hou, and J. Lin. 2014. 'Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates butyrate-induced intestinal barrier impairment in a Caco-2 cell monolayer model', *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 59: 264-9.
- Ibáñez, C. F. 2013a. 'Structure and physiology of the RET receptor tyrosine kinase', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5.
- Ibáñez, Carlos F. 2013b. 'Structure and physiology of the RET receptor tyrosine kinase', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5: a009134.
- Ibiza, S., B. García-Cassani, H. Ribeiro, T. Carvalho, L. Almeida, R. Marques, A. M. Mistic, C. Bartow-McKenney, D. M. Larson, W. J. Pavan, G. Eberl, E. A. Grice, and H. Veiga-Fernandes. 2016. 'Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence', *Nature*, 535: 440-43.
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. 'A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity', *Science*, 337: 816-21.
- Jing, S., D. Wen, Y. Yu, P. L. Holst, Y. Luo, M. Fang, R. Tamir, L. Antonio, Z. Hu, R. Cupples, J. C. Louis, S. Hu, B. W. Altrock, and G. M. Fox. 1996. 'GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF', *Cell*, 85: 1113-24.
- Kaboord, B., and M. Perr. 2008. 'Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation', *Methods Mol Biol*, 424: 349-64.
- Kannapin, F., T. Schmitz, J. Hansmann, N. Schlegel, and M. Meir. 2022. 'Correction to: Measurements of transepithelial electrical resistance (TEER) are affected by junctional length in immature epithelial monolayers', *Histochem Cell Biol*, 157: 119.
- Kapuscinski, J. 1995. 'DAPI: a DNA-specific fluorescent probe', *Biotech Histochem*, 70: 220-33.
- Kaser, A., S. Zeissig, and R. S. Blumberg. 2010. 'Inflammatory bowel disease', *Annu Rev Immunol*, 28: 573-621.
- Kearon, J. E., S. C. Kocherry, D. Zoumboulakis, D. Rivera, S. R. Lourenssen, and M. G. Blennerhassett. 2021. 'GDNF requires HIF-1 $\alpha$  and RET activation for

- suppression of programmed cell death of enteric neurons by metabolic challenge', *Mol Cell Neurosci*, 115: 103655.
- Kottke, M. D., E. Delva, and A. P. Kowalczyk. 2006. 'The desmosome: cell science lessons from human diseases', *J Cell Sci*, 119: 797-806.
- Kowalczyk, A. P., and K. J. Green. 2013. 'Structure, function, and regulation of desmosomes', *Prog Mol Biol Transl Sci*, 116: 95-118.
- Kramer, E. R., and B. Liss. 2015. 'GDNF-Ret signaling in midbrain dopaminergic neurons and its implication for Parkinson disease', *FEBS Lett*, 589: 3760-72.
- Krug, S. M., J. D. Schulzke, and M. Fromm. 2014. 'Tight junction, selective permeability, and related diseases', *Seminars in cell & developmental biology*, 36: 166-76.
- Kupka, T., J. Simova, J. Dvorackova, L. Martinek, O. Motyka, M. Uvirova, and P. Dite. 2018. 'Crohn's disease - genetic factors and progress of the disease', *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 162: 139-43.
- Labun, K., T. G. Montague, J. A. Gagnon, S. B. Thyme, and E. Valen. 2016. 'CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering', *Nucleic Acids Res*, 44: W272-6.
- Laemmli, U. 1970. 'Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis', *Nature*, 227: 680-86.
- Lake, J. I., and R. O. Heuckeroth. 2013. 'Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 305: G1-24.
- Lameris, A. L., S. Huybers, K. Kaukinen, T. H. Makela, R. J. Bindels, J. G. Hoenderop, and P. I. Nevalainen. 2013. 'Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease', *Scand J Gastroenterol*, 48: 58-69.
- Landy, J., E. Ronde, N. English, S. K. Clark, A. L. Hart, S. C. Knight, P. J. Ciclitira, and H. O. Al-Hassi. 2016. 'Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer', *World J Gastroenterol*, 22: 3117-26.
- Lin, L. F., D. H. Doherty, J. D. Lile, S. Bektesh, and F. Collins. 1993. 'GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons', *Science*, 260: 1130-2.
- Lu, Z., L. Ding, Q. Lu, and Y. H. Chen. 2013. 'Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases', *Tissue Barriers*, 1: e24978.
- Lüllmann-Rauch, Renate, and Esther Asan. 2019. 'Speiseröhre und Magen-Darm-Kanal.' in Renate Lüllmann-Rauch and Esther Asan (eds.), *Taschenlehrbuch Histologie* (Georg Thieme Verlag).
- Maehara, Y., H. Anai, R. Tamada, and K. Sugimachi. 1987. 'The ATP assay is more sensitive than the succinate dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability', *Eur J Cancer Clin Oncol*, 23: 273-6.

- Mankertz, J., M. Amasheh, S. M. Krug, A. Fromm, S. Amasheh, B. Hillenbrand, S. Tavalali, M. Fromm, and J. D. Schulzke. 2009. 'TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling', *Cell Tissue Res*, 336: 67-77.
- Martini, E., S. M. Krug, B. Siegmund, M. F. Neurath, and C. Becker. 2017. 'Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease', *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 4: 33-46.
- McGovern, D. P., S. Kugathasan, and J. H. Cho. 2015. 'Genetics of Inflammatory Bowel Diseases', *Gastroenterology*, 149: 1163-76.e2.
- Meir, M., N. Burkard, H. Ungewiss, M. Diefenbacher, S. Flemming, F. Kannapin, C. T. Germer, M. Schweinlin, M. Metzger, J. Waschke, and N. Schlegel. 2019. 'Neurotrophic factor GDNF regulates intestinal barrier function in inflammatory bowel disease', *J Clin Invest*, 129: 2824-40.
- Meir, M., S. Flemming, N. Burkard, L. Bergauer, M. Metzger, C. T. Germer, and N. Schlegel. 2015. 'Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes barrier maturation and wound healing in intestinal epithelial cells in vitro', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 309: G613-24.
- Meir, M., J. Salm, C. Fey, M. Schweinlin, C. Kollmann, F. Kannapin, C. T. Germer, J. Waschke, C. Beck, N. Burkard, M. Metzger, and N. Schlegel. 2020. 'Enteroids Generated from Patients with Severe Inflammation in Crohn's Disease Maintain Alterations of Junctional Proteins', *J Crohns Colitis*, 14: 1473-87.
- Meir, Michael, Felix Kannapin, Markus Diefenbacher, Yalda Ghoreishi, Catherine Kollmann, Sven Flemming, Christoph-Thomas Germer, Jens Waschke, Patrick Leven, Reiner Schneider, Sven Wehner, Natalie Burkard, and Nicolas Schlegel. 2021. 'Intestinal Epithelial Barrier Maturation by Enteric Glial Cells is GDNF-Dependent', *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 1887.
- Michielan, A., and R. D'Incà. 2015. 'Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut', *Mediators Inflamm*, 2015: 628157.
- Moriez, R., C. Salvador-Cartier, V. Theodorou, J. Fioramonti, H. Eutamene, and L. Bueno. 2005. 'Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats', *Am J Pathol*, 167: 1071-9.
- Mulligan, Lois M. 2019. 'GDNF and the RET Receptor in Cancer: New Insights and Therapeutic Potential', *Frontiers in physiology*, 9: 1873-73.
- Mullis, Kary, Fred Faloona, Stephen Scharf, RK Saiki, GT Horn, and H Erlich. 1986. "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 263-73. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Neunlist, M., F. Toumi, T. Oreschkova, M. Denis, J. Leborgne, C. L. Laboisse, J. P. Galmiche, and A. Jarry. 2003. 'Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 285: G1028-36.

- Neunlist, M., L. Van Landeghem, A. Bourreille, and T. Savidge. 2008. 'Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease', *J Intern Med*, 263: 577-83.
- Ortega-de San Luis, Clara, and Alberto Pascual. 2016. 'Simultaneous Detection of Both GDNF and GFR $\alpha$ 1 Expression Patterns in the Mouse Central Nervous System', *Frontiers in neuroanatomy*, 10: 73-73.
- Osborn, L. M., W. Kamphuis, W. J. Wadman, and E. M. Hol. 2016. 'Astrogliosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease', *Prog Neurobiol*, 144: 121-41.
- Paratcha, G., F. Ledda, and C. F. Ibanez. 2003. 'The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands', *Cell*, 113: 867-79.
- Passaro, A., G. L. Russo, F. Passiglia, M. D'Arcangelo, A. Sbrana, M. Russano, L. Bonanno, R. Giusti, G. Metro, F. Bertolini, S. Grisanti, A. Carta, F. Cecere, M. Montrone, G. Massa, F. Perrone, F. Simionato, G. Guaitoli, V. Scotti, C. Genova, A. Lugini, L. Bonomi, I. Attili, and F. de Marinis. 2022. 'Pralsetinib in RET fusion-positive non-small-cell lung cancer: A real-world data (RWD) analysis from the Italian expanded access program (EAP)', *Lung Cancer*, 174: 118-24.
- Peeters, M., Y. Ghoo, B. Maes, M. Hiele, K. Geboes, G. Vantrappen, and P. Rutgeerts. 1994. 'Increased permeability of macroscopically normal small bowel in Crohn's disease', *Dig Dis Sci*, 39: 2170-6.
- Pekny, M., U. Wilhelmsson, and M. Pekna. 2014. 'The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis', *Neurosci Lett*, 565: 30-8.
- Petty, R. D., L. A. Sutherland, E. M. Hunter, and I. A. Cree. 1995. 'Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number', *J Biolumin Chemilumin*, 10: 29-34.
- Pochard, C., S. Coquenlorge, M. Freyssinet, P. Naveilhan, A. Bourreille, M. Neunlist, and M. Rolli-Derkinderen. 2018. 'The multiple faces of inflammatory enteric glial cells: is Crohn's disease a gliopathy?', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 315: G1-g11.
- Pochard, C., S. Coquenlorge, J. Jaulin, N. Cenac, N. Vergnolle, G. Meurette, M. Freyssinet, M. Neunlist, and M. Rolli-Derkinderen. 2016. 'Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human Enteric Glial Cells From Patients With Crohn's Disease', *Gastroenterology*, 150: 168-80.
- Preiss, J. C., B. Bokemeyer, H. J. Buhr, A. Dignass, W. Hauser, F. Hartmann, K. R. Herrlinger, B. Kaltz, P. Kienle, W. Kruis, T. Kucharzik, J. Langhorst, S. Schreiber, B. Siegmund, A. Stallmach, E. F. Stange, J. Stein, and J. C. Hoffmann. 2014. '[Updated German clinical practice guideline on "Diagnosis and treatment of Crohn's disease" 2014]', *Z Gastroenterol*, 52: 1431-84.
- Pronobis, M. I., and M. Peifer. 2012. 'Wnt signaling: the many interfaces of beta-catenin', *Curr Biol*, 22: R137-9.

- Quiros, Miguel, and Asma Nusrat. 2014. 'RhoGTPases, actomyosin signaling and regulation of the epithelial Apical Junctional Complex', *Seminars in cell & developmental biology*, 36: 194-203.
- Quirós, Miguel, and Asma Nusrat. 2019. 'Contribution of Wound-Associated Cells and Mediators in Orchestrating Gastrointestinal Mucosal Wound Repair', *Annu Rev Physiol*, 81: 189-209.
- Rädler, U, and Joachim Wegener. 2009. 'Impedanz-basiertes Screening adhärenter Zellen: automatisiert, nicht-invasiv, label-frei und vielseitig', *Spektrum*, 5: 474-76.
- Rao, M., B. D. Nelms, L. Dong, V. Salinas-Rios, M. Rutlin, M. D. Gershon, and G. Corfas. 2015. 'Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system', *Glia*, 63: 2040-57.
- Rao, M., D. Rastelli, L. Dong, S. Chiu, W. Setlik, M. D. Gershon, and G. Corfas. 2017. 'Enteric Glia Regulate Gastrointestinal Motility but Are Not Required for Maintenance of the Epithelium in Mice', *Gastroenterology*, 153: 1068-81.e7.
- Renart, Jaime, Jakob Reiser, and George R Stark. 1979. 'Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76: 3116-20.
- Rosenthal, R., D. Günzel, J. Piontek, S. M. Krug, C. Ayala-Torres, C. Hempel, D. Theune, and M. Fromm. 2020. 'Claudin-15 forms a water channel through the tight junction with distinct function compared to claudin-2', *Acta Physiol (Oxf)*, 228: e13334.
- Ruhl, A., J. Trotter, and W. Stremmel. 2001. 'Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglial cell lines from the myenteric plexus of adult rat', *Neurogastroenterol Motil*, 13: 95-106.
- Salim, S. Y., and J. D. Soderholm. 2011. 'Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases', *Inflamm Bowel Dis*, 17: 362-81.
- Sambuy, Y., I. De Angelis, G. Ranaldi, M. L. Scarino, A. Stammati, and F. Zucco. 2005. 'The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics', *Cell Biol Toxicol*, 21: 1-26.
- Sander, J. D., and J. K. Joung. 2014. 'CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes', *Nat Biotechnol*, 32: 347-55.
- Sariola, H., and M. Saarma. 2003. 'Novel functions and signalling pathways for GDNF', *J Cell Sci*, 116: 3855-62.
- Savidge, T. C., P. Newman, C. Pothoulakis, A. Ruhl, M. Neunlist, A. Bourreille, R. Hurst, and M. V. Sofroniew. 2007. 'Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione', *Gastroenterology*, 132: 1344-58.
- Schlegel, N., K. Boerner, and J. Waschke. 2021. 'Targeting desmosomal adhesion and signalling for intestinal barrier stabilization in inflammatory bowel diseases-

- Lessons from experimental models and patients', *Acta Physiol (Oxf)*, 231: e13492.
- Schlegel, N., M. Meir, W. M. Heupel, B. Holthofer, R. E. Leube, and J. Waschke. 2010. 'Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 298: G774-83.
- Schmitz, H., M. Fromm, C. J. Bentzel, P. Scholz, K. Detjen, J. Mankertz, H. Bode, H. J. Epple, E. O. Riecken, and J. D. Schulzke. 1999. 'Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6', *J Cell Sci*, 112 ( Pt 1): 137-46.
- Schneider, S., C. M. Wright, and R. O. Heuckeroth. 2019. 'Unexpected Roles for the Second Brain: Enteric Nervous System as Master Regulator of Bowel Function', *Annu Rev Physiol*, 81: 235-59.
- Schulzke, J. D., S. Ploeger, M. Amasheh, A. Fromm, S. Zeissig, H. Troeger, J. Richter, C. Bojarski, M. Schumann, and M. Fromm. 2009. 'Epithelial tight junctions in intestinal inflammation', *Ann N Y Acad Sci*, 1165: 294-300.
- Shah, B., and L. Mayer. 2010. 'Current status of monoclonal antibody therapy for the treatment of inflammatory bowel disease', *Expert Rev Clin Immunol*, 6: 607-20.
- Soret, R., S. Coquenlorge, F. Cossais, G. Meurette, M. Rolli-Derkinderen, and M. Neunlist. 2013. 'Characterization of human, mouse, and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells', *Neurogastroenterol Motil*, 25: e755-64.
- Spindler, V., M. Meir, B. Vigh, S. Flemming, K. Hutz, C. T. Germer, J. Waschke, and N. Schlegel. 2015. 'Loss of Desmoglein 2 Contributes to the Pathogenesis of Crohn's Disease', *Inflamm Bowel Dis*, 21: 2349-59.
- Spindler, V., and J. Waschke. 2018. 'Pemphigus-A Disease of Desmosome Dysfunction Caused by Multiple Mechanisms', *Front Immunol*, 9: 136.
- Srinivasan, B., A. R. Kolli, M. B. Esch, H. E. Abaci, M. L. Shuler, and J. J. Hickman. 2015. 'TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems', *J Lab Autom*, 20: 107-26.
- Stallmach, A, W Häuser, H L'hoest, and U Marschall. 2012. 'Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa: Herausforderungen an die Versorgung', *Barmer GEK Gesundheitswesen aktuell*: 286-309.
- Steinkamp, M., I. Geerling, T. Seufferlein, G. von Boyen, B. Egger, J. Grossmann, L. Ludwig, G. Adler, and M. Reinshagen. 2003. 'Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells', *Gastroenterology*, 124: 1748-57.
- Steinkamp, M., H. Gundel, N. Schulte, U. Spaniol, C. Pflueger, E. Zizer, and G. B. von Boyen. 2012. 'GDNF protects enteric glia from apoptosis: evidence for an autocrine loop', *BMC Gastroenterol*, 12: 6.
- Strober, W., A. Kitani, I. Fuss, N. Asano, and T. Watanabe. 2008. 'The molecular basis of NOD2 susceptibility mutations in Crohn's disease', *Mucosal Immunol*, 1 Suppl 1: S5-9.



- Subbiah, V., J. F. Gainor, R. Rahal, J. D. Brubaker, J. L. Kim, M. Maynard, W. Hu, Q. Cao, M. P. Sheets, D. Wilson, K. J. Wilson, L. DiPietro, P. Fleming, M. Palmer, M. I. Hu, L. Wirth, M. S. Brose, S. I. Ou, M. Taylor, E. Garralda, S. Miller, B. Wolf, C. Lengauer, T. Guzi, and E. K. Evans. 2018. 'Precision Targeted Therapy with BLU-667 for RET-Driven Cancers', *Cancer Discov*, 8: 836-49.
- Subbiah, V., D. Yang, V. Velcheti, A. Drilon, and F. Meric-Bernstam. 2020. 'State-of-the-Art Strategies for Targeting RET-Dependent Cancers', *J Clin Oncol*: Jco1902551.
- Subramaniam, S., J. Strelau, and K. Unsicker. 2008. 'GDNF prevents TGF-beta-induced damage of the plasma membrane in cerebellar granule neurons by suppressing activation of p38-MAPK via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway', *Cell Tissue Res*, 331: 373-83.
- Takahashi, Masahide. 2001. 'The GDNF/RET signaling pathway and human diseases', *Cytokine & growth factor reviews*, 12: 361-73.
- Taylor, Matthew H., Justin F. Gainor, Mimi I-Nan Hu, Viola Weijia Zhu, Gilberto Lopes, Sophie Leboulleux, Marcia S. Brose, Martin H. Schuler, Daniel W. Bowles, Dong-Wan Kim, Christina S Baik, Elena Garralda, Chia-Chi Lin, Douglas Adkins, Debashis Sarker, Giuseppe Curigliano, Hui Zhang, Corinne Clifford, Christopher D. Turner, and Vivek Subbiah. 2019. 'Activity and tolerability of BLU-667, a highly potent and selective RET inhibitor, in patients with advanced RET-altered thyroid cancers', *Journal of Clinical Oncology*, 37: 6018-18.
- Tilghman, J. M., A. Y. Ling, T. N. Turner, M. X. Sosa, N. Krumm, S. Chatterjee, A. Kapoor, B. P. Coe, K. H. Nguyen, N. Gupta, S. Gabriel, E. E. Eichler, C. Berrios, and A. Chakravarti. 2019. 'Molecular Genetic Anatomy and Risk Profile of Hirschsprung's Disease', *N Engl J Med*, 380: 1421-32.
- Towbin, Harry, Theophil Staehelin, and Julian Gordon. 1979. 'Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76: 4350-54.
- Truelove, S. C., and W. C. Richards. 1956. 'Biopsy studies in ulcerative colitis', *Br Med J*, 1: 1315-8.
- Tsang, V., A. Gill, M. Gild, B. Lurie, L. Blumer, R. Siddall, R. Clifton-Bligh, and B. Robinson. 2022. 'Selpercatinib Treatment of RET-Mutated Thyroid Cancers Is Associated With Gastrointestinal Adverse Effects', *J Clin Endocrinol Metab*, 107: e3824-e29.
- Turner, J. R. 2009. 'Intestinal mucosal barrier function in health and disease', *Nat Rev Immunol*, 9: 799-809.
- Uhlig, H. H. 2013. 'Monogenic diseases associated with intestinal inflammation: implications for the understanding of inflammatory bowel disease', *Gut*, 62: 1795-805.
- Ungewiss, H., F. Vielmuth, S. T. Suzuki, A. Maiser, H. Harz, H. Leonhardt, D. Kugelmann, N. Schlegel, and J. Waschke. 2017. 'Desmoglein 2 regulates the

- intestinal epithelial barrier via p38 mitogen-activated protein kinase', *Sci Rep*, 7: 6329.
- van Roy, F., and G. Berx. 2008. 'The cell-cell adhesion molecule E-cadherin', *Cell Mol Life Sci*, 65: 3756-88.
- Vergnolle, Nathalie, and Carla Cirillo. 2018. 'Neurons and glia in the enteric nervous system and epithelial barrier function', *Physiology*, 33: 269-80.
- Villanacci, V., G. Bassotti, R. Nascimbeni, E. Antonelli, M. Cadei, S. Fisogni, B. Salerni, and K. Geboes. 2008. 'Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases', *Neurogastroenterol Motil*, 20: 1009-16.
- von Boyen, G. B., N. Schulte, C. Pfluger, U. Spaniol, C. Hartmann, and M. Steinkamp. 2011. 'Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation', *BMC Gastroenterol*, 11: 3.
- von Boyen, G. B., M. Steinkamp, I. Geerling, M. Reinshagen, K. H. Schafer, G. Adler, and J. Kirsch. 2006. 'Proinflammatory Cytokines Induce Neurotrophic Factor Expression in Enteric Glia: A Key to the Regulation of Epithelial Apoptosis in Crohn's Disease', *Inflamm Bowel Dis*, 12: 346-54.
- von Boyen, G. B., M. Steinkamp, M. Reinshagen, K. H. Schafer, G. Adler, and J. Kirsch. 2004. 'Proinflammatory Cytokines Increase Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Enteric Glia', *Gut*, 53: 222-8.
- Wehkamp, J., M. Gotz, K. Herrlinger, W. Steurer, and E. F. Stange. 2016. 'Inflammatory Bowel Disease', *Dtsch Arztebl Int*, 113: 72-82.
- Whone, A., M. Luz, M. Boca, M. Woolley, L. Mooney, S. Dharia, J. Broadfoot, D. Cronin, C. Schroers, N. U. Barua, L. Longpre, C. L. Barclay, C. Boiko, G. A. Johnson, H. C. Fibiger, R. Harrison, O. Lewis, G. Pritchard, M. Howell, C. Irving, D. Johnson, S. Kinch, C. Marshall, A. D. Lawrence, S. Blinder, V. Sossi, A. J. Stoessl, P. Skinner, E. Mohr, and S. S. Gill. 2019. 'Randomized trial of intermittent intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease', *Brain*, 142: 512-25.
- Williams, J. M., C. A. Duckworth, M. D. Burkitt, A. J. Watson, B. J. Campbell, and D. M. Pritchard. 2015. 'Epithelial cell shedding and barrier function: a matter of life and death at the small intestinal villus tip', *Vet Pathol*, 52: 445-55.
- Xiao, W., W. Wang, W. Chen, L. Sun, X. Li, C. Zhang, and H. Yang. 2014. 'GDNF is involved in the barrier-inducing effect of enteric glial cells on intestinal epithelial cells under acute ischemia reperfusion stimulation', *Mol Neurobiol*, 50: 274-89.
- Xiao, Y. T., W. H. Yan, Y. Cao, J. K. Yan, and W. Cai. 2017. 'P38 MAPK Pharmacological Inhibitor SB203580 Alleviates Total Parenteral Nutrition-Induced Loss of Intestinal Barrier Function but Promotes Hepatocyte Lipoapoptosis', *Cell Physiol Biochem*, 41: 623-34.
- Xie, Q., X. Chen, Z. M. Meng, X. L. Huang, Q. Zhang, J. Q. Zhou, L. Zhang, F. Q. He, Y. P. Zou, and H. T. Gan. 2020. 'Glial-derived neurotrophic factor regulates enteric mast cells and ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis', *Int Immunopharmacol*, 85: 106638.

- Yoo, Jun-Hwan, and Mark Donowitz. 2019. 'Intestinal enteroids/organoids: A novel platform for drug discovery in inflammatory bowel diseases', *World J Gastroenterol*, 25: 4125-47.
- Young, Emma. 2012. 'Gut instincts: The secrets of your second brain', *New Scientist*, 216: 38-42.
- Yulis, M., M. Quiros, R. Hilgarth, C. A. Parkos, and A. Nusrat. 2018. 'Intracellular Desmoglein-2 cleavage sensitizes epithelial cells to apoptosis in response to pro-inflammatory cytokines', *Cell Death Dis*, 9: 389.
- Zarubin, T., and J. Han. 2005. 'Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway', *Cell Res*, 15: 11-8.
- Zeissig, S., N. Burgel, D. Gunzel, J. Richter, J. Mankertz, U. Wahnschaffe, A. J. Kroesen, M. Zeitz, M. Fromm, and J. D. Schulzke. 2007. 'Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease', *Gut*, 56: 61-72.
- Zhang, D. K., F. Q. He, T. K. Li, X. H. Pang, D. J. Cui, Q. Xie, X. L. Huang, and H. T. Gan. 2010. 'Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis', *J Pathol*, 222: 213-22.
- Zhang, Y. Z., and Y. Y. Li. 2014. 'Inflammatory bowel disease: pathogenesis', *World J Gastroenterol*, 20: 91-9.
- Zheng, T., B. Zhang, C. Chen, J. Ma, D. Meng, J. Huang, R. Hu, X. Liu, K. Otsu, A. C. Liu, H. Li, Z. Yin, and G. Huang. 2018. 'Protein kinase p38alpha signaling in dendritic cells regulates colon inflammation and tumorigenesis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: E12313-e22.
- Zolotarevsky, Y., G. Hecht, A. Koutsouris, D. E. Gonzalez, C. Quan, J. Tom, R. J. Mrsny, and J. R. Turner. 2002. 'A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in in vitro models of intestinal disease', *Gastroenterology*, 123: 163-72.
- Zucco, F., A. F. Batto, G. Bises, J. Chambaz, A. Chiusolo, R. Consalvo, H. Cross, G. Dal Negro, I. de Angelis, G. Fabre, F. Guillou, S. Hoffman, L. Laplanche, E. Morel, M. Pinçon-Raymond, P. Prieto, L. Turco, G. Ranaldi, M. Rousset, Y. Sambuy, M. L. Scarino, F. Torreilles, and A. Stammati. 2005. 'An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of Caco-2 cell lines', *Altern Lab Anim*, 33: 603-18.

## Appendix

### I Abkürzungsverzeichnis

15-HETE	15-Hydroxyeicosatetraensäure
5-HT	Serotonin
BCA	Bicinchinon-Säure-Methode
B2M	β2-Mikroglobulin
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA-NGS	Bovine serum albumine-Normal goat serum: 0,1-prozentiges Rinderserumalbumin mit 10%igem Ziegenserum in PBS
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
Cl	Claudin
CRISPER	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CU	Colitis Ulcerosa
DAPI	4',6 Diamidin-2-phenylindol (DAPI)
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagles Medium
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
DSS	Dextran-Sulfat-Natrium
DTT	Dithiothreitol
E-Cadherin	Epitheliales Cadherin
ECIS	Electric Cellsubstrate Impedance Sensing
EGC	Enterische Gliazellen
EGF	epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
engl.	Englisch
ENS	Enterisches Nervensystem
F-Aktin	Filamentäres Aktin
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GFAP	Saures Gliafaserprotein
GFL	GDNF-family Ligands

GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GFR $\alpha$	GDNF-Familienrezeptor alpha
GPI	Glykosylphosphatidinositol
GSH	Glutathion
GSNO	S-Nitrosogluthation
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IGF	insulin-like growth factor
IL-1 $\beta$	Interleukin-1-beta
ILC3	group 3 innate lymphoid cells
JAM	Junktions Adhäsions Molekül
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide
LTA-SA	Lipoteichoensäure aus Staphylokokkus aureus
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinasen
MC	Morbus Crohn
MDT	Magen-Darm-Trakt
MHC II	Major-histocompatibility complex II molecules
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
MTT	Tetrazolium-Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NCAM	neural celladhesion molecule
NGF	Nerve growth factor
NO	Stickstoffmonoxid
NPY	Neuropeptid Y
NT	Non Target
OD	Optische Dichte
P/S	50U/ml Penicillin-G und 50 $\mu$ g Streptomycin
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PBS	Phosphathaltige Pufferlösung
P <sub>E</sub>	Permeabilitätskoeffizient
PFA	Paraformaldehydlösung
PLP-1	Proteolipid Protein 1
PNS	Peripheres Nervensystem
POX	Meerrettich-Peroxidase

RET	Rearranged during transfection
rGDNF	Rekombinantes GDNF
sgRNA	Single guide RNA
siRNA	Small interfering RNA
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TGF $\beta$	Transforming growth factor beta
TLR2	Toll-like-Rezeptor 2
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
Tween	Polyethylenglykol-Sorbitan-Fettsäureester
Tyr	Tyrosinrest
VIP	Intestinales Polypeptid
vs.	versus
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	Zonula occludens

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: OP-Situs und Endoskopie-Bild bei Morbus Crohn .....	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Wandschichten des MDT .....	10
Abbildung 3: Schlussleistenkomplex .....	15
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Signaltransduktion über den RET-Rezeptor .....	25
Abbildung 5: Schematische Darstellung des ENS .....	27
Abbildung 6: Konfluenzstadien von Caco2-Zellen .....	29
Abbildung 7: Transwell-Filter .....	36
Abbildung 8: NT-siRNA mit GFP-Tag .....	48
Abbildung 9: EGC mit GFP-Tag und schematische Darstellung CRISPR/Cas .....	50
Abbildung 10: Schema Immunpräzipitation.....	53
Abbildung 11: Differenzierung von Caco-2-Zellen im zeitlichen Verlauf .....	61
Abbildung 12: Veränderungen der Permeabilität und Lokalisation von Junktionsproteinen.....	64
Abbildung 13: GDNF-Rezeptorexpression in den verwendeten Zelllinien .....	65
Abbildung 14: GDNF-Expression in Vollwand- und Mukosa-Lysaten.....	66
Abbildung 15: GDNF-Immunpräzipitation aus Zellüberstand.....	68
Abbildung 16: GDNF-Knockdown in EGC mithilfe von CRISPR-Cas .....	70
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung von Caco-2-Zellen unter verschiedenen Versuchsbedingungen.....	72
Abbildung 18: Der Ret-Inhibitor Blue667 hemmt GDNF-Effekte auf Enterozyten .....	75
Abbildung 19: GDNF-Effekte auf Enterozyten sind RET-abhängig .....	77
Abbildung 20: GDNF-Expression und Sekretion in EGC nach Zytokin-Behandlung...	79
Abbildung 21: Zellviabilität nach Zytokin-Behandlung .....	80
Abbildung 22: GDNF- und RET-Rezeptor-vermittelter barriestabilisierender Effekt im Inflammationsmodell .....	82
Abbildung 23: Barriestabilisierende Wirkung einer EGC-Ko-Kultur im Inflammationsmodell.....	83
Abbildung 24: Eine RET-Inhibition schwächt den barriestabilisierenden Effekt von EGC ab. ....	84
Abbildung 25: Expressionsmuster von Junktionsproteinen nach der Behandlung mit TNF- $\alpha$ .....	85

Abbildung 26: Inflammations-Score der verwendeten Patientenproben des terminalen Ileums .....	88
Abbildung 27: GDNF-Expression der gesamten Darmwand bei CED im Western Blot	89
Abbildung 28: GDNF-Konzentration der gesamten Darmwand bei CED im ELISA ...	90
Abbildung 29: Vimentin-Analyse von Ileum-Proben im Western Blot .....	91
Abbildung 30: GDNF-Expression der Mukosa bei CED im Western Blot und ELISA	93



### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper indirekte Immunfluoreszenz .....	31
Tabelle 2: Antikörper Western Blot .....	32
Tabelle 3: Verdünnungsreihe .....	43
Tabelle 4: Oligonukleotide CRISPER/Cas.....	49
Tabelle 5: Primer qPCR.....	57
Tabelle 6: Einteilung histopathologischer Befund .....	87
Tabelle 7: Kontrollpatienten.....	130
Tabelle 8: CED-Patienten.....	131

## IV Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen

### Publikationsliste:

**Kannapin F**, Schmitz T, Hansmann J, Schlegel N, Meir M. Measurements of transepithelial electrical resistance (TEER) are affected by junctional length in immature epithelial monolayers. *Histochem Cell Biol.* 2021 Dec;156(6):609-616. PMID: 34940901.

Meir M, **Kannapin F**, Diefenbacher M, Ghoreishi Y, Kollmann C, Flemming S, Germer CT, Waschke J, Leven P, Schneider R, Wehner S, Burkard N, Schlegel N. Intestinal Epithelial Barrier Maturation by Enteric Glial Cells Is GDNF-Dependent. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 14;22(4):1887. doi: 10.3390/ijms22041887. PMID: 33672854; PMCID: PMC7917776.

Burkard N, Meir M, **Kannapin F**, Otto C, Petzke M, Germer CT, Waschke J, Schlegel N. Desmoglein2 Regulates Claudin2 Expression by Sequestering PI-3-Kinase in Intestinal Epithelial Cells. *Front Immunol.* 2021 Sep 30;12:756321. doi: 10.3389/fimmu.2021.756321. PMID: 34659262; PMCID: PMC8514949.

Meir M, Salm J, Fey C, Schweinlin M, Kollmann C, **Kannapin F**, Germer CT, Waschke J, Beck C, Burkard N, Metzger M, Schlegel N. Enteroids Generated from Patients with Severe Inflammation in Crohn's Disease Maintain Alterations of Junctional Proteins. *J Crohns Colitis.* 2020 Oct 5;14(10):1473-1487. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjaa085. PMID: 32342109.

Meir M, Burkard N, Ungewiß H, Diefenbacher M, Flemming S, **Kannapin F**, Germer CT, Schweinlin M, Metzger M, Waschke J, Schlegel N. Neurotrophic factor GDNF regulates intestinal barrier function in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 2019 Jun 17;129(7):2824-2840. doi: 10.1172/JCI120261. PMID: 31205031; PMCID: PMC6597228.

Desweiteren wurden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Rahmen von Konferenzbeiträgen vor einem Fachpublikum präsentiert:

Titel: *Intestinal epithelial barriere maturation by enteric glial cells is glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)-dependent*, Experimental Biology 2018 in San Diego USA, Referent: Felix Kannapin

Titel: *GDNF-induced intestinal epithelial barrier stabilization is RET-dependent*, Experimental Biology 2019 in Orlando USA, Referent: Prof. Dr. Nicolas Schlegel

## V Patientencharakteristika der verwendeten Darmgewebeproben

**Tabelle 7: Kontrollpatienten**

Pseudonym	Geschlecht	Alter (Jahre)	Diagnose	Resektat (verwendetes Gewebe)
Kontrolle 1	w	64	Kolon ascendens Karzinom	Kolon (Mukosa = M)
Kontrolle 34	w	72	Kolon ascendens Karzinom	Kolon (Vollwand = VW) / (M)
Kontrolle 35	w	68	Kolon ascendens Karzinom	Kolon (VW)
Kontrolle 37	m	72	Rektumkarzinom	Kolon (VW/M)
Kontrolle 38	w	57	Rektumkarzinom	Kolon (VW/M)
Kontrolle 12	m	44	nicht bekannt	Ileum (M)
Kontrolle 13	m	73	nicht bekannt	Ileum (M)
Kontrolle 14	m	71	Kolon ascendens Polyp	Ileum (VW/M)
Kontrolle 18	m	82	Kolon ascendens Polyp	Ileum (M)
Kontrolle 19	m	60	Caecum Polyp	Ileum (VW/M)
Kontrolle 21	w	76	Caecum Karzinom	Ileum (M)
Kontrolle 24	w	59	NET (neuroendokriner Tumor)	Ileum (VW/M)
Kontrolle 25	m	66	NET	Ileum (VW)
Kontrolle 31	w	46	NET	Ileum (VW)

**Tabelle 8: CED-Patienten**

<b>Pseudonym</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter (Jahre)</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Resektat (verwendetes Gewebe)</b>
Dsg 2	w	55	Morbus Crohn (MC)	Ileum (M)
Dsg 4	w	26	MC	Ileum (M)
Dsg 30	w	48	MC	Ileum (M)
Dsg 31	m	54	MC	Ileum (M)
Dsg 40	m	53	Colitis ulcerosa (CU)	Kolon (M)
Dsg 45	m	48	CU	Kolon (VW/M)
Dsg 52	m	63	CU	Kolon (VW/M)
Dsg 57	m	25	MC	Ileum (M)
Dsg 59	m	41	CU	Kolon (VW/M)
Dsg 61	m	24	MC	Ileum (VW)
Dsg 63	m	32	MC	Ileum (VW)
Dsg 65	w	41	CU	Kolon (VW/M)
Dsg 67	w	45	MC	Ileum (M)
Dsg 69	m	43	MC	Ileum, (VW)
Dsg 70	w	22	MC	Ileum (VW)

Dsg 71	w	62	MC	Ileum (VW/M)
Dsg 72	m	53	CU	Kolon (VW)
Dsg 74	m	43	MC	Ileum (VW/M)
Dsg 76	w	30	MC	Ileum (VW)
Dsg77	m	25	CU	Kolon (VW/M)
Dsg 78	m	31	MC	Ileum (VW)
Dsg 83	m	59	CU	Kolon (VW/M)
Dsg 87	m	18	MC	Ileum (M)
Dsg 89	w	67	CU	Kolon (VW/M)