

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

Die Wirkung proinflammatorischer Zytokine an murinen intestinalen Organoiden

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Svenja Mareike Pauer

Tierärztin aus Heidelberg

Gießen (2025)

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Diener
 2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner
- Prüfer: Prof. Dr. Sabine Wenisch

Tag der Disputation:

03.06.2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1. Abkürzungsverzeichnis.....	- 1 -
2. Einleitung.....	- 5 -
2.1 Inflammatory bowel disease (IBD).....	- 5 -
2.2 Epithelbarriere im Darm	- 7 -
2.3 Intestinale Organoide	- 10 -
2.4 Proinflammatorische Zytokine.....	- 12 -
2.4.1 Tumornekrosefaktor alpha (TNF α).....	- 13 -
2.4.2 Interleukin 1 beta (IL-1 β).....	- 13 -
2.4.3 Interferon gamma (IFN γ)	- 14 -
2.5 Effekte der Zytokine auf das Darmepithel.....	- 16 -
2.6 Chloridsekretion am Darmepithel.....	- 19 -
2.7 Ca ²⁺ -Signaling.....	- 22 -
3. Fragestellung der Dissertation	- 24 -
4. Material und Methoden.....	- 25 -
4.1 Lösungen.....	- 25 -
4.1.1 Lösungen für die Zellkultur	- 25 -
4.1.2 Lösungen zum Fixieren und Einbetten	- 26 -
4.1.3 Lösungen für das Ca ²⁺ -Imaging	- 26 -
4.1.4 Lösungen für die Immunfluoreszenz	- 27 -
4.1.5 Lösungen für die 30 min Schwellungsversuche	- 28 -
4.2 Substanzen	- 28 -

Inhaltsverzeichnis

4.3	Tiere und Präparation der Organoide.....	- 29 -
4.4	Kultivierung der Organoide	- 32 -
4.4.1	Passagieren	- 32 -
4.4.2	Einfrieren und Auftauen.....	- 33 -
4.5	Ca ²⁺ -Imaging mit Fura-2-AM.....	- 34 -
4.5.1	Prinzip des Ca ²⁺ -Imaging	- 34 -
4.5.2	Messstand	- 35 -
4.5.3	Durchführung	- 36 -
4.5.4	Auswertung der Ca ²⁺ -Imaging Daten.....	- 38 -
4.6	Fixieren und Einbetten der Organoide für Färbungen	- 38 -
4.7	Immunfluoreszenzfärbungen	- 40 -
4.7.1	Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz.....	- 40 -
4.7.2	Durchführung	- 41 -
4.7.3	Auswertung der Apoptoserate.....	- 42 -
4.8	Histologische Färbungen	- 43 -
4.8.1	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	- 43 -
4.8.2	Periodic Acid Schiff (PAS)-Färbung	- 43 -
4.8.3	Eindeckeln.....	- 43 -
4.9	Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR).....	- 44 -
4.9.1	Prinzip der qPCR.....	- 44 -
4.9.2	RNA-Isolierung aus Organoiden.....	- 46 -
4.9.3	Umschreiben in cDNA	- 46 -
4.9.4	Referenzgene.....	- 47 -
4.9.5	Durchführung der qPCR	- 47 -

Inhaltsverzeichnis

4.9.6	Auswertung der qPCR Daten	- 49 -
4.10	Schwellungsversuche	- 50 -
4.10.1	Prinzip	- 50 -
4.10.2	Zeitraffer.....	- 50 -
4.10.3	Bumetanid und Indometacin	- 51 -
4.10.4	Auswertung der Schwellungsversuche	- 52 -
5.	Statistik	- 53 -
6.	Ergebnisse	- 54 -
6.1	Organoidmodell	- 54 -
6.1.1	Morphologische Charakterisierung	- 54 -
6.1.2	Schwellungsversuche	- 57 -
6.2	Tumornekrosefaktor α	- 59 -
6.2.1	Morphologie	- 59 -
6.2.2	Apoptoserate	- 61 -
6.2.3	Schwellung durch TNF α	- 63 -
6.2.4	Veränderte Genexpression nach TNF α	- 64 -
6.2.5	Immunfluoreszenz von NKCC1	- 66 -
6.2.6	Bumetanid reduziert die TNF α -induzierte Schwellung	- 68 -
6.2.7	Ca ²⁺ -Imaging.....	- 70 -
6.3	Interleukin 1 β	- 76 -
6.3.1	Morphologie	- 76 -
6.3.2	Ca ²⁺ -Imaging	- 76 -
6.4	Interferon γ	- 78 -
6.4.1	Morphologie	- 78 -

Inhaltsverzeichnis

6.4.2	Ca ²⁺ -Imaging	- 79 -
6.5	Zytokin-Mix	- 81 -
6.5.1	Morphologie	- 81 -
6.5.2	Zunahme der relativen Lumengröße	- 82 -
6.5.3	Bumetanid reduziert die Zytokin-Mix induzierte Schwellung	- 83 -
6.5.4	Genexpression von Anionenkanälen/-transportern	- 85 -
6.5.5	Einfluss auf die Epithelbarriere	- 86 -
6.5.6	Ca ²⁺ -Imaging	- 87 -
6.5.7	Rezeptoren und Transporter der intrazellulären Ca ²⁺ -Speicher	- 93 -
6.5.8	Rezeptoren und Proteine der cholinergen Signalkaskade	- 94 -
7.	Diskussion	- 96 -
7.1	Intestinale Organoiden und ihr Einsatz als Entzündungsmodell	- 97 -
7.2	Effekte der Zytokine auf die Epithelbarriere	- 98 -
7.2.1	Claudine	- 98 -
7.2.2	Mucine	- 99 -
7.3	Apoptose	- 100 -
7.4	Einfluss der Zytokine auf die Sekretion	- 101 -
7.5	Modulation der Ca ²⁺ -Antwort	- 103 -
7.5.1	Bedeutung des zytosolischen Ca ²⁺ für die Regulation der Sekretion	- 103 -
7.5.2	Veränderung des Ca ²⁺ -Signaling durch Zytokine	- 104 -
7.6	Limitationen des intestinalen Organoidmodells	- 111 -
7.7	Ausblick auf zukünftige Projekte	- 113 -
8.	Zusammenfassung	- 115 -

Inhaltsverzeichnis

9. Summary.....	- 117 -
10. Verzeichnisse.....	- 119 -
10.1 Abbildungsverzeichnis.....	- 119 -
10.2 Tabellenverzeichnis	- 121 -
10.3 Literaturverzeichnis	- 122 -
11. Eigene Veröffentlichungen.....	- 145 -
11.1 Publikation	- 145 -
11.2 Manuskript in Vorbereitung.....	- 145 -
11.3 Beiträge zu Postern und Vorträgen auf Konferenzen	- 145 -
12. Danksagung	- 147 -
13. Erklärung	- 149 -

1. Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variances)
Aqua bidest.	Bidestilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
Cch	Carbachol
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Cldn	Claudin
COX2	Cyclooxygenase 2
CPA	Cyclopiazonsäure
DAG	Diacylglycerin
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	Dextran sodium sulfate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal regulated kinases
FKS	Fetales Kälberserum
Fura-2-AM	Fura-2-Acetoxymethylester
Gapdh	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
G_qα	Guanine nucleotide binding protein polypeptide q subunit alpha
Gusb	β-Glucuronidase

Abkürzungsverzeichnis

HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
IBD	Inflammatory bowel disease
IκBα	NF- κ b inhibitor alpha
IL-1α	Interleukin 1 alpha
IL-1β	Interleukin 1 beta
IL-1R	Interleukin 1 Rezeptor
IL-1RA	Interleukin 1 Rezeptorantagonist
IL-1RAcP	Interleukin 1 receptor accessory protein
IFN-γ	Interferon gamma
IFNGR	Interferon gamma Rezeptor
IP₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
Jak	Januskinase
JAM	Junctional adhesion molecule
KCNN4	Calciumabhängiger Kaliumkanal (Potassium calcium-activated channel subfamily N member 4)
Lgr5	Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5
M₃	Muskarinrezeptor 3
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MHC I/II	Major histocompatibility complex I/II
MLC	Myosinleichtkette (Myosin light chain)
MLCK	Myosinleichtkettenkinase (Myosin light chain kinase)
NaGluc	Natriumgluconat
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NKCC1	Natrium-Kalium-2-Chlorid-Cotransporter 1
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain 2
ORAI	Calcium release-activated calcium modulator

Abkürzungsverzeichnis

PAS	Periodic Acid Schiff
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatpuffersalzlösung (Phosphate-buffered saline)
PFA	Paraformaldehyd
PGE₂	Prostaglandin E ₂
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RhoA	Transforming protein RhoA
ROCK	Rho-associated protein kinase
ROI	Region of interest
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Runden pro Minute
RyR	Ryanodinrezeptor
SEM	Mittlerer Fehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
SERCA	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums
SOCE	Store-operated Ca ²⁺ entry
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
STIM	Stromal interacting molecule
TGFβ	Transforming growth factor beta
Th1-/Th2-Zellen	T-Helfer-Zellen des Typ 1/2
TMEM16A	Calciumabhängiger Chloridkanal (transmembrane protein 16)
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor

Abkürzungsverzeichnis

TRP	Transient receptor potential
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume; ml/100 ml in %)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume; g/100 ml in %)
ZO-1	Zonula Occludens Protein 1
Zytokin-Mix /Z-Mix	TNF α (100 ng/ml) + IL-1 β (20 ng/ml) + IFN γ (100 pg/ml)

2. Einleitung

2.1 Inflammatory bowel disease (IBD)

Unter chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, auch Inflammatory bowel diseases (IBD) genannt, versteht man eine Gruppe von Erkrankungen, bei denen der Darmtrakt der Patienten chronisch entzündlich verändert ist. Hierzu zählen die Krankheiten Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Doch nicht nur Menschen, sondern auch Hunde und Katzen können an IBD erkranken (Jergens und Simpson 2012). Die Erkrankung geht sowohl bei Mensch als auch bei Tier mit wiederkehrenden Symptomen wie abdominalen Schmerzen, Diarrhoe, ungewolltem Gewichtsverlust, blutigem Stuhl oder Anämie einher (Jergens und Simpson 2012; Yu und Rodriguez 2017). Besonders beim Menschen kommt es aber auch zu durch systemische Entzündungen ausgelösten Beschwerden wie u.a. Arthritis, Uveitis und Pankreatitis (Rogler et al. 2021). Dadurch und aufgrund ihres chronischen Verlaufs führt IBD zu einer deutlichen Reduktion der Lebensqualität für die Patienten. IBD ist eine weltweit verbreitete Erkrankung, die 2019 4,9 Millionen Menschen betraf (Wang et al. 2023). Trotz hoher Prävalenzen besonders in westlichen Industriestaaten ist der Pathomechanismus von IBD weiterhin nicht vollständig geklärt. Umweltfaktoren scheinen eine wichtige Rolle in der Entstehung der Krankheit zu spielen. So erhöhen u.a. stark verarbeitete Lebensmittel, sehr fettreiche Nahrung sowie viele Zusatzstoffe, aber auch Rauchen, niedrige Vitamin D-Spiegel und orale Verhütungsmittel das Risiko zu erkranken (Kaplan und Ng 2017). Auch eine gute Hygiene und geringer Kontakt zu Tieren scheint die Entstehung von IBD zu begünstigen (Kaplan und Ng 2017). Neben Umweltfaktoren sind auch genetische Dispositionen von großer Bedeutung. Mehr als 240 Genloci, die das Risiko für IBD erhöhen, wurden bereits identifiziert. Eine Mutation in dem Gen der Nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2), welche eine Rolle in der Erkennung und Autophagie von mikrobiellen Bestandteilen spielt, wird z.B. stark mit dem Auftreten von Morbus Crohn assoziiert (Guan 2019).

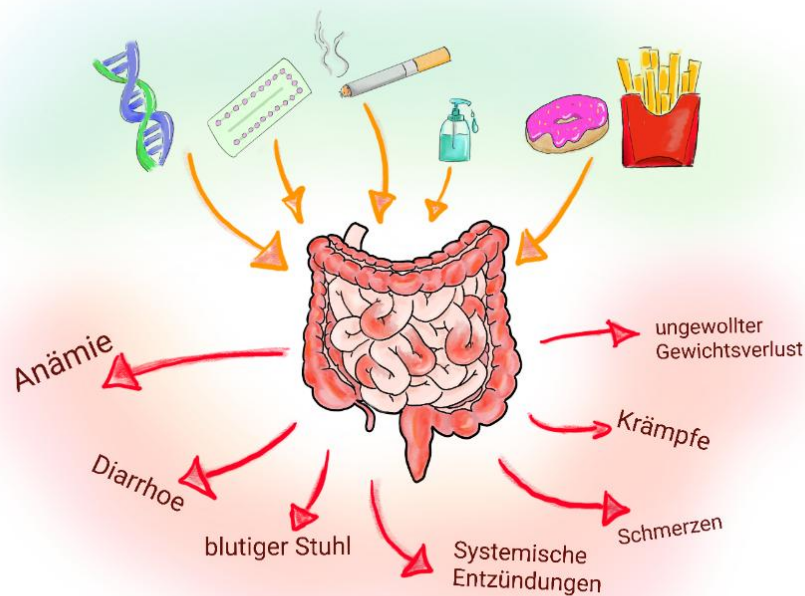


Abbildung 1: Risiken und Symptome von IBD

IBD ist eine multifaktorielle Krankheit, deren Risiko von genetischen und Umweltfaktoren beeinflusst wird. Die Symptome können vielfältig und schwerwiegend sein.

Das komplexe Zusammenspiel von Umweltfaktoren und genetischen Dispositionen führt letztlich zu einer geschwächten Barriere des Darmepithels und dem Eindringen von eigentlich harmlosen Substanzen und Mikroorganismen in tiefere Schichten der Darmwand. Dies kann eine permanente und/oder rezidivierende Aktivierung von Immunreaktionen des Körpers auslösen, welche die schwerwiegenden Symptome hervorrufen kann. Daher sind die Epithelbarriere im Darm und die Reaktion des Immunsystems nicht nur in der Pathogenese, sondern auch als mögliche Ziele einer Therapie von großem Interesse.

2.2 Epithelbarriere im Darm

Der Darm ist die größte Kontaktfläche des Körpers von Mensch und Tier zur Umwelt und ihren Pathogenen. Hierbei besteht im Darm die Schwierigkeit, zwischen gefährlichen und harmlosen Mikroorganismen zu unterscheiden, den Körper vor deren Eindringen zu schützen und gleichzeitig die Resorption wichtiger Nährstoffe zu gewährleisten. Neben der protektiven, von Becherzellen produzierten Mucinschicht ist die Epithelbarriere, gebildet von Tight Junctions, Adherent Junctions und Desmosomen, daher besonders im Darm von großer Bedeutung (Groschwitz und Hogan 2009). Wie dicht oder leak diese Barriere ist, wird hauptsächlich von Tight Junctions bestimmt. Sie umgeben den apikalen Bereich der Epithelzellen und sind so nicht nur für den Zusammenhalt der Epithelzellen, sondern auch für die Regulation des parazellulären Transports wichtig. So verhindern sie nicht nur das Eindringen von Substanzen in ihrer Funktion als „fence“, sondern ermöglichen als „gate“ auch die selektive Resorption oder Sekretion von Stoffen, wie z.B. Ionen (Gumbiner 1987). Die Zonula occludens, ein Teil der Tight Junctions, bildet einen Ring um die Epithelzelle und verbindet die einzelnen Zellen, zusammen mit den basal gelegenen Adherens Junctions und Desmosomen, zu einem Gewebe. Verankert sind sowohl die Zonulae occludentes als auch die Adherent Junctions in einem Actomyosin-Gürtel, einem Teil des Zytoskeletts (Citi et al. 2024; Perl et al. 2024).

Der Bestandteil der Tight Junctions, welcher für den parazellulären Transport und dessen Selektivität für Anionen oder Kationen die wichtigste Rolle spielt, sind die Proteine aus der Familie der Claudine. Die große Vielfalt der Claudine, welche sowohl eine darmabschnittspezifische Lokalisation als auch einen spezifischen Gradienten in der Villus/Krypten-Achse aufzeigen, ermöglicht es die Durchlässigkeit des Epithels den Gegebenheiten anzupassen. So erhöhen porenformende Claudine wie Claudin 2 und 15 die Permeabilität, während andere Claudine wie Claudin 1, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 18 und 19 die Barriere des Epithels stärken (Garcia-Hernandez et al. 2017). Neuere Studien zeigen, dass manche Claudine, wie z.B. Claudin 2, auch die Proliferation und Migration der Epithelzellen beeinflussen (Dhawan et al. 2011; Capaldo 2023). Neben Claudinen und

dem Protein Zonula Occludens-1 (ZO-1) bestehen Tight Junctions noch aus sogenannten Tight junction-associated marvel proteins (TAMPs), zu welchen Occludin, Tricellulin und MarvelD3 zählen (Raleigh et al. 2010). Sie spielen eine Rolle in der Bildung von Tight Junctions und sind verantwortlich für die Komplexität des Netzwerks aus anastomisierenden Proteinsträngen, aus denen diese Zellkontakte bestehen (Saito et al. 2021a). Auch Moleküle der Junctional adhesion molecules (JAM) Familie finden sich in der Region der Tight Junctions. Sie interagieren mit zytoplasmatischen scaffolding Proteinen, wie ZO-1, und insbesondere JAM-A spielt in der Regulation der Darmbarriere eine große Rolle, da es vermutlich die Expression von Claudin 10 und 15 reduziert (Hartmann et al. 2020).

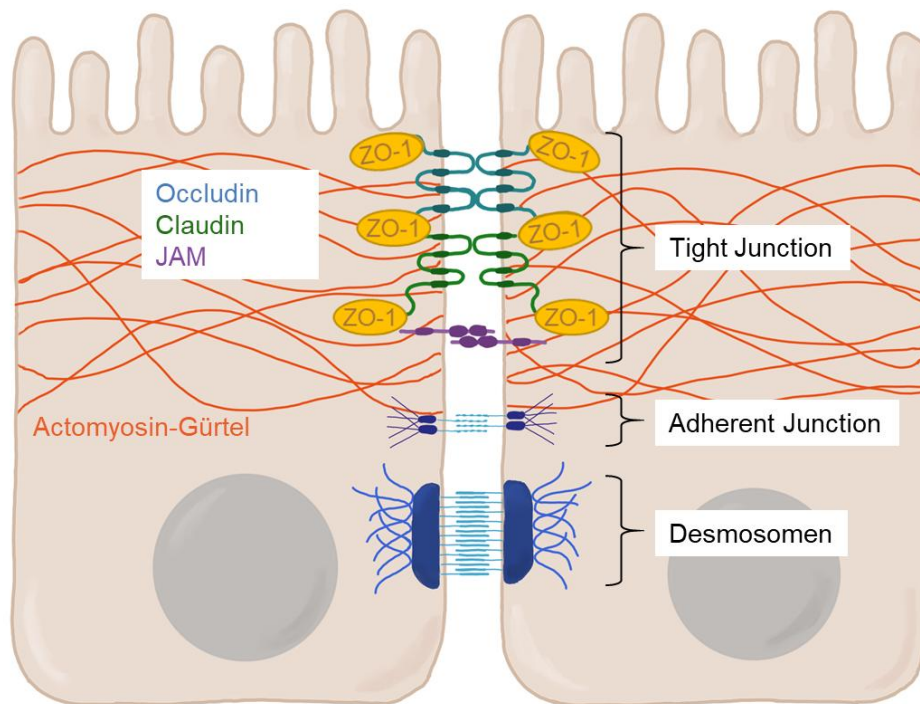


Abbildung 2: Epithelbarriere im Darm

Die Zell-Zell-Verbindungen werden von Tight Junctions, Adherent Junctions und Desmosomen gebildet. Die apikal gelegenen Tight Junctions und Adherent Junctions sind in dem Actomyosin-Gürtel, einem Teil des Zytoskeletts, verankert. Tight Junctions sind über das Protein Zonula Occludens-1 verankert und bestehen weiterhin aus sogenannten Tight junction-associated marvel proteins (TAMPs), zu denen Occludin zählt, porenbildendem oder abdichtendem Claudin sowie Junctional adhesion molecules (JAM).

2.3 Intestinale Organoid

Die wohl komplexesten und am weitesten verbreiteten Modelle, um an IBD zu forschen, sind In-vivo-Modelle. Doch ob nun z.B. eine chemische Induktion einer Kolitis durch Dextran sodium sulfate (DSS), das Hapten 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) oder aber ein T-Zell-Transfer (Manicassamy und Manoharan 2014) die Entzündung auslöst, die In-vivo-Modelle sind immer mit Schmerzen, Leiden und Schäden für die Tiere verbunden. Im Sinne der 3R Prinzipien (Replacement, Reduction und Refinement; Russell und Burch 1960) ist es daher wichtig, nach anderen Modellen zu suchen. Organoid stellen eine solche Alternative da.

Dünndarmorganoid sind 3D-Zellstrukturen, die aus proliferierenden Lgr5⁺ Stammzellen entstehen, welche auf ihrer Oberfläche den G-Protein gekoppelten Rezeptor Lgr5 (Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5) exprimieren (Mizutani und Clevers 2020). Sie können sich in alle im Dünndarmepithel vorkommenden Zelltypen differenzieren. Hierzu zählen die für die Resorption zuständigen Enterozyten, die Mucin-produzierenden Becherzellen, die Hormon-produzierenden enteroendokrinen Zellen, die als Chemorezeptoren wirkenden Bürstenzellen (Tuft cells) und die Paneth Zellen, welche antimikrobielle Substanzen synthetisieren und diese in Granulaform speichern bzw. freisetzen (Barreto E Barreto et al. 2022; Du et al. 2023). Die Zellen bilden ein einschichtiges Epithel aus hochprismatischen Zellen mit einer nach außen gewandten basalen und einer nach innen gewandten luminalen Seite. Die Organoid wachsen in einer Basalmembran-artigen dreidimensionalen Matrix (z.B. Matrigel®) unter dem Einfluss spezifischer Wachstumsfaktoren (wie z.B. Wnt3a, Rspodin-1 und Noggin) und bilden dabei kryptenähnliche Strukturen aus (Almeqdadi et al. 2019). Mit ihrer Zelldiversität und ihrer 3D-Struktur sind sie viel genutzten Tumorzelllinien, wie z.B. Caco-2 Zellen, in ihrer Komplexität überlegen und haben gegenüber gewöhnlichen Primärkulturen den Vorteil, dass sie dank der Stammzellen über Monate kultivierbar sind (Yoo und Donowitz 2019).

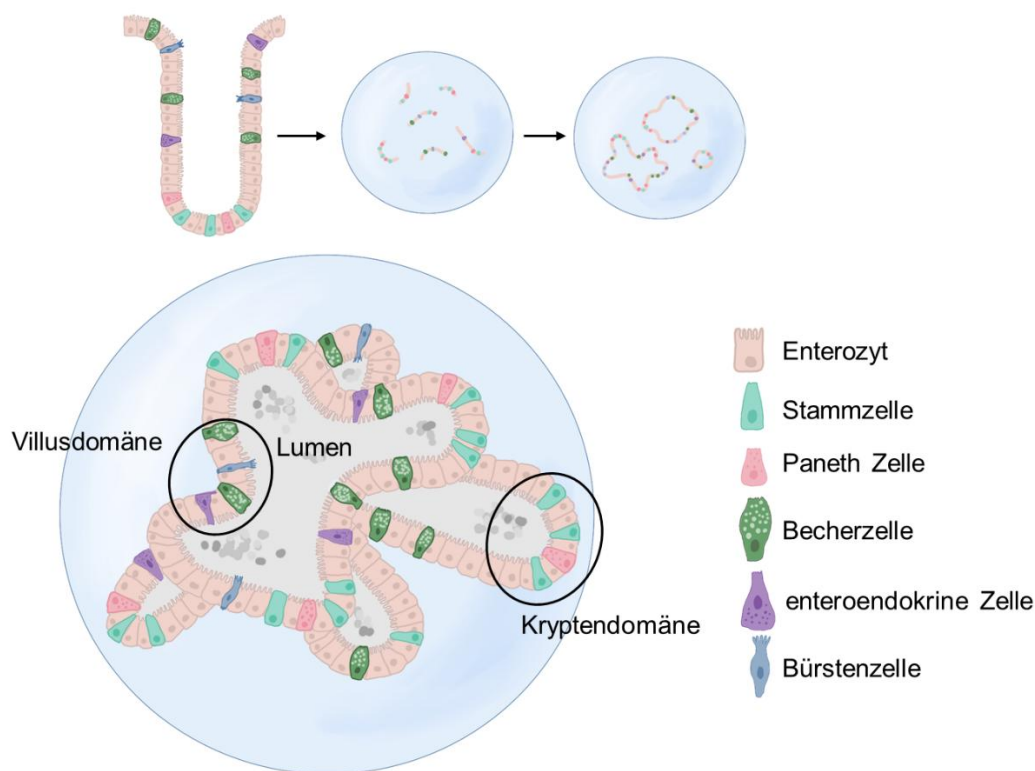


Abbildung 3: Organoide

Organoide sind 3D-Strukturen, die aus in Krypten enthaltenen Stammzellen wachsen, welche in eine Matrix wie z.B. Matrigel® eingebettet sind. Sie enthalten alle im Darmepithel vorhandenen Zelltypen.

Erstmals gelang es Sato et al. (2009) Darmorganoide zu kultivieren. Seitdem hat sich das Modell deutlich weiterentwickelt. So gibt es inzwischen Co-Kulturen z.B. mit Neuronen des enterischen Nervensystems, subepithelialen Myofibroblasten oder Makrophagen (Noel et al. 2017; Puzan et al. 2018). Die für die Kultivierung benötigten Stammzellen können aus Biopsien oder auch induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) gewonnen werden (Yoo und Donowitz 2019; Gleeson et al. 2020). Dies eröffnet neue Möglichkeiten für den patientenspezifischen Test von Therapeutika z.B. zur Tumorthherapie (Almeqdadi et al. 2019; Mertens et al. 2023). Doch murine intestinale Organoide sind auch von großem Interesse für die Grundlagenforschung, da sie ein gutes Modell darstellen, um u.a. Transportprozesse am Darmepithel zu erforschen (Zietek et al. 2015). So kann z.B. nach einem „Umdrehen“ der Organoide im sogenannten Apical-out Modell, in welchem der apikale Pol der Epithelzellen nach außen weist, die

Resorption von Nährstoffen oder die Wirkung bzw. Aufnahme von Pharmaka in das Darmepithel untersucht werden (Kakni et al. 2023). Eine andere Möglichkeit – und diese steht zentral im Fokus meiner Arbeit – ist der Einsatz von Organoiden als Modell für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, indem die Darmorganoide mit bei IBD hochregulierten proinflammatorischen Zytokinen inkubiert werden (Xing et al. 2023).

2.4 Proinflammatorische Zytokine

Zytokine sind kleine Glykoproteine, die v.a. von Zellen des Immunsystems, aber auch anderen Zelltypen, wie z.B. Epithelzellen, freigesetzt werden. Als Botenstoffe können sie endokrin, parakrin oder autokrin wirken. Die Ausschüttung von Zytokinen kann Zellen des Immunsystems aktivieren, aber auch direkte Effekte auf z.B. umliegende Zellen haben, indem sie an spezifische Rezeptoren binden. Diese Effekte können sehr unterschiedlich sein. So kann z.B. Tumornekrosefaktor α (TNF α) über den TNF-Rezeptor 1 die Apoptose einer Zelle auslösen (Huyghe et al. 2023), wohingegen Transforming growth factor β (TGF β) die Expression von Tight Junction Proteinen erhöht und damit die Integrität der Epithelbarriere stärkt (Neurath 2024). Ein Ungleichgewicht von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen scheint eine wichtige Ursache für die Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu sein (Sanchez-Muñoz et al. 2008). In meiner Arbeit wurden die proinflammatorischen Zytokine TNF α , Interleukin 1 β (IL-1 β) und Interferon γ (IFN γ) verwendet, die bei IBD und auch in Kolitismodellen beim Tier stark hochreguliert werden (Pérez-Navarro et al. 2005; Singh et al. 2016; Nakase et al. 2022). Auf deren Wirkung soll daher im Folgenden genauer eingegangen werden.

2.4.1 Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)

Das proinflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor α (TNF α) wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen produziert. Es ist wichtig für die Rekrutierung weiterer Immunzellen und aktiviert durch die Bindung an die TNF Rezeptoren (TNFR) 1 und 2 den Mitogen-activated protein kinase (MAPK) sowie den Nuclear factor- κ B (NF- κ B)-Signalweg (Moens et al. 2013; van Loo und Bertrand 2023). Dies stimuliert die Transkription proinflammatorischer Gene und die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie weiteren Zytokinen und Chemokinen. Die Bindung von TNF α an TNFR1 kann auch die Apoptose einer Zelle einleiten, wobei auch andere Formen des lytischen Zelltods ausgelöst werden können wie etwa sekundäre Nekrose, Nekroptose oder Pyroptose (Huyghe et al. 2023). Durch die Lyse der Zellmembran kommt es zur Freisetzung von sogenannten Damage-associated molecular patterns (DAMPs), also Strukturen, über die Nachbarzellen eine Gewebeschädigung erkennen (van Loo und Bertrand 2023; Huyghe et al. 2023). Sie binden über Pattern recognition Rezeptoren, wie z.B. Toll-like Rezeptoren, an benachbarte Zellen und leiten so proinflammatorische Signale weiter (Boyapati et al. 2016). TNF α -Inhibitoren (i.d.R. monoklonale Antikörper gegen TNF α) werden bereits erfolgreich für die Therapie von IBD eingesetzt (Neurath 2024).

2.4.2 Interleukin 1 beta (IL-1 β)

Interleukin 1 β (IL-1 β) ist Teil der IL-1 Familie, zu welcher auch IL-1 α (Interleukin 1 alpha) und IL-1RA (Interleukin 1 Rezeptorantagonist) gehören. Das Zytokin wird von Makrophagen und Monozyten, aber auch vielen anderen Zellen, wie z.B. Epithelzellen, freigesetzt (Waterhouse und Stadnyk 1999; Lopez-Castejon und Brough 2011). Die Aufgabe des Entzündungsmediators besteht darin, die Reaktion auf Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) und DAMPS zu kontrollieren. Die Bindung von IL-1 β an den IL-1 Rezeptor 1 (IL-1R1) und dessen Co-Rezeptor aktiviert den MAPK- und den NF- κ B-Signalweg und führt zur Produktion von Entzündungsmediatoren, wie u.a. den Zytokinen IL-6, IL-8, oder der vermehrten Expression des Enzyms Cyclooxygenase 2

(COX2; Weber et al. 2010), welches ein Schlüsselenzym in der Produktion von Prostaglandinen darstellt (Caughey et al. 2001). Neben diesen Stoffen wird auch die Expression von IL-1 β -eigenen Genen hochreguliert. Dies führt über autokrine und parakrine Freisetzung von IL-1 β zu einem positiven Feedback. Die Bindung von IL-1 β an den IL-1R2 hingegen hat keinerlei Effekt. Der Rezeptor scheint nur als eine Art Rezeptorattrappe („decoy receptor“) für IL-1 β zu dienen, welche das IL-1 β abfängt, bevor es an seinen eigentlichen Rezeptor andocken kann (Dinarello 1996; Weber et al. 2010). Kontrolliert wird die IL-1 β -Wirkung u.a. durch die Regulierung des NALP3 (NACHT, leucine-rich region, and PYD domains containing protein 3) -Inflammasoms, welches die Vorstufe proIL-1 β in ihre aktive Form IL-1 β umwandelt (Pétrilli et al. 2007).

2.4.3 Interferon gamma (IFN γ)

Das Zytokin IFN γ ist das einzige Mitglied der Typ II Interferone und wurde ursprünglich als Macrophage-activating factor bezeichnet (Schroder et al. 2004). Die Produktion von IFN γ findet in Immunzellen wie Makrophagen und natürlichen Killerzellen, aber auch in B- und T-Zellen, stimuliert durch die Zytokine IL-12 und -18, statt. IFN γ bindet an den IFN γ -Rezeptor und aktiviert so die Januskinasen (Jak) 1 und 2, welche sich gegenseitig und zusätzlich STAT1-Moleküle (Signal transducer and activator of transcription 1) phosphorylieren (Woznicki et al. 2021). Das dadurch entstehende Homodimer wandert in den Zellkern und fördert dort die Transkription von proinflammatorischen Genen. Über diesen Signalweg induziert IFN γ u.a. die vermehrte Expression von MHC (Major histocompatibility complex) I und II-Rezeptoren, von mit Apoptose assoziierten Proteinen, wie z.B. Interferon Regulatory Faktor 1 oder „Death-associated proteins“, sowie Proteinen, die für die Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verantwortlich sind (Schroder et al. 2004). Auch die Art der Immunantwort wird durch IFN γ beeinflusst, indem eine Immunantwort des Th1-Typs, also eine zellvermittelte Immunantwort insbesondere durch Aktivierung von Makrophagen und Killerzellen, gefördert wird. Gleichzeitig hemmt IFN γ die Immunantwort des Th2-Typs, welche die humorale Immunreaktion durch die

Aktivierung der Differenzierung von B-Lymphozyten fördert (Teixeira et al. 2005; Butcher und Zhu 2021).

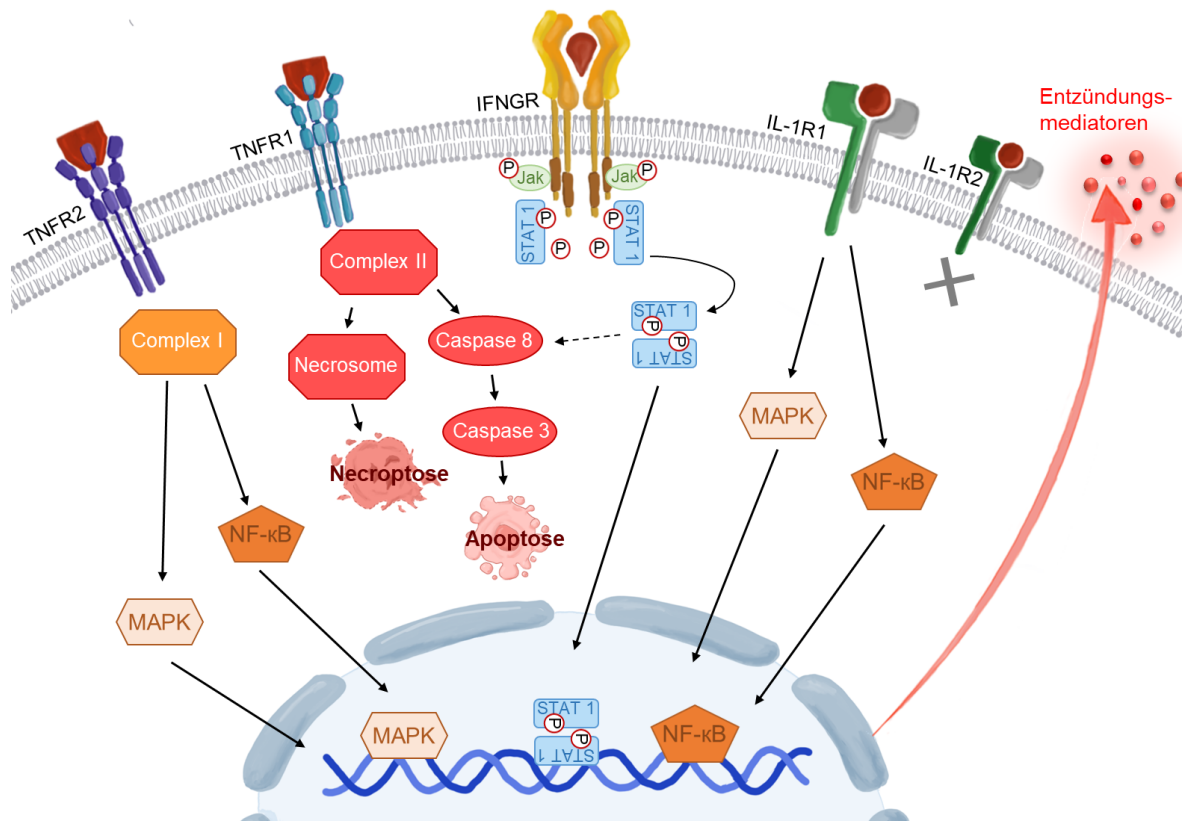


Abbildung 4: Signalwege der Zytokine

TNF α bindet an Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 und 2 (TNFR1/2) und aktiviert so den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) und MAPK (Mitogen-activated protein kinase) oder über die Bindung an TNFR1 die Apoptose durch die Aktivierung der Caspase 3. IFN γ bindet an den IFN γ -Rezeptor (IFNGR) wodurch Jak 1 und 2 phosphoryliert und aktiviert werden und zwei STAT1 zu einem Homodimer, dem aktiven Transkriptionsfaktor, phosphoryliert werden. IL-1 β bindet an den IL-1-Rezeptor 1 (IL-1R1) mit dem assoziierten Co-Rezeptor IL-1RAcP (grau) und aktiviert so NF- κ B und MAPK. Die Bindung von IL-1 β an den IL-1R2 hat keinen Effekt.

2.5 Effekte der Zytokine auf das Darmepithel

Proinflammatorische Zytokine wirken nicht nur auf Zellen des Immunsystems, sondern auch auf das umliegende Gewebe. Dabei können sie sehr unterschiedliche Effekte auf das Darmepithel ausüben, welche sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig zu sein scheinen. Folgende Effekte der Zytokine $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{IFN}\gamma$ auf das Darmepithel sind bisher bekannt:

Der wohl am besten untersuchte Effekt proinflammatorischer Zytokine ist ihr Einfluss auf die Epithelbarriere, wobei ihnen v.a. eine Erhöhung der Permeabilität zugeschrieben wird. Durch die Bindung von $\text{IL-1}\beta$ an seinen Rezeptor und die darauffolgende Aktivierung des $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Signalwegs sowie der Aktivierung von ERK (Extracellular-signal regulated kinases) 1 und 2, welche wichtige Zellfunktionen wie Proliferation, Wachstum oder wie in diesem Fall die Umstrukturierung des Zytoskeletts steuern (Wortzel und Seger 2011), kommt es u.a. zu einer erhöhten Expression der Myosinleichtkettenkinase (Myosin light chain kinase, MLCK). Die MLCK phosphoryliert die Myosinleichtkette (Myosin light chain; MLC), was die Kontraktion des apikal in den Epithelzellen lokalisierten Aktomyosin-Gürtels und damit das „Auseinanderziehen“ und Öffnen der Tight Junctions bewirkt (Abbildung 5; Kaminsky et al. 2021). Auch $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ erhöhen über diesen Mechanismus die Permeabilität des Darmepithels. Doch während die Bindung von $\text{TNF}\alpha$ an den TNFR-2 auch den ERK1/2- sowie den $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Signalweg aktiviert, induziert $\text{IFN}\gamma$ die Kontraktion des Aktomyosins über den Transforming protein RhoA/ROCK (Rho-associated protein kinase) -Signalweg (Al-Sadi et al. 2013; Xiong et al. 2017; Meyer et al. 2023).

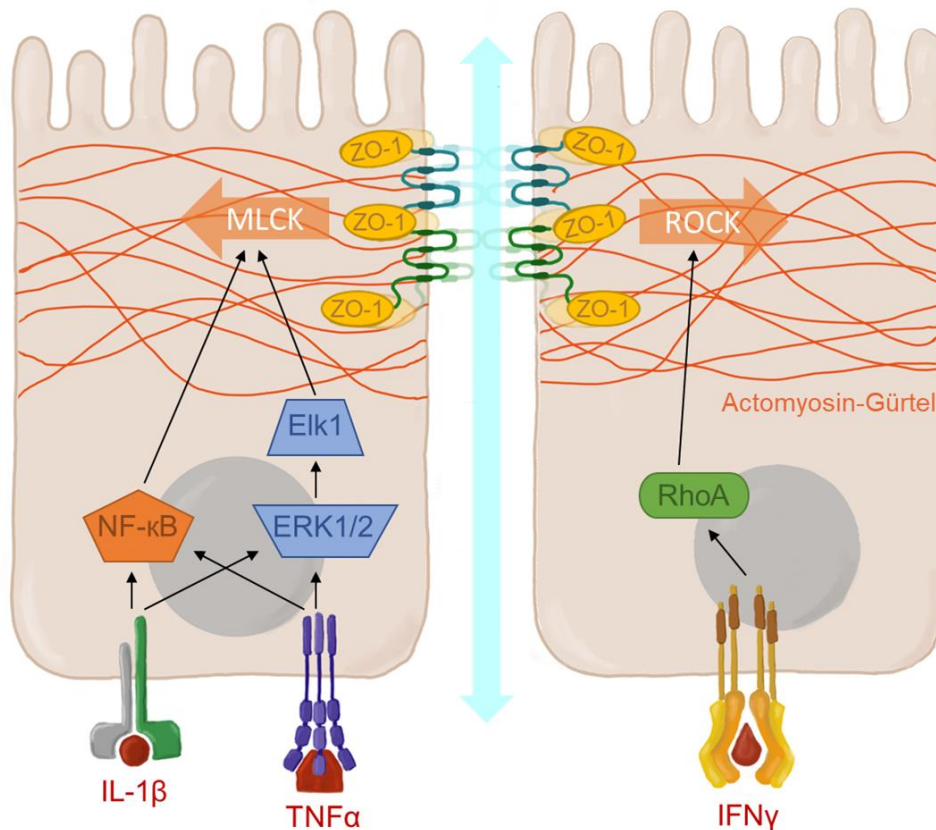


Abbildung 5: Erhöhung der parazellulären Permeabilität

Sowohl $IL-1\beta$ als auch $TNF\alpha$ und $IFN\gamma$ erhöhen durch Effekte an der Myosin light chain (MLC) und der damit einhergehenden Kontraktion des Aktomyosins durch Auseinanderziehen der Tight Junctions die parazelluläre Permeabilität. $TNF\alpha$ und $IL-1\beta$ wirken dabei über den NF- κ B-Signalweg und eine Aktivierung der ERK 1/2, welche über das ETS like-1 protein (Elk-1) die MLCK aktiviert. Im Gegensatz dazu aktiviert $IFN\gamma$ über das Transforming protein RhoA die Rho-associated protein kinase (ROCK).

Eine weitere Möglichkeit, die Permeabilität des Epithels zu beeinflussen, ist das Einwirken auf die Expression von Claudinen. $TNF\alpha$ induziert z.B. eine vermehrte Expression von Claudin 2, einem porenformenden Claudin, welches den parazellulären Transport von Wasser und kleinen Kationen ermöglicht (Rosenthal et al. 2010), alleine (Mankertz et al. 2009) und in Kombination mit $IFN\gamma$ (Huang et al. 2021). $IFN\gamma$ allein

scheint hingegen die Expression von Claudin 2 zu verringern (Wisner et al. 2008). Der genaue Effekt der Zytokine auf die Expression der Claudine ist jedoch auf Grund widersprüchlicher Ergebnisse nicht abschließend geklärt (Prasad et al. 2005; Mankertz und Schulzke 2007; Gleeson et al. 2020). Auch die Endozytose und der Abbau von Occludin kann durch $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{IL-1}\beta$ induziert werden (Buschmann et al. 2013; Kaminsky et al. 2021).

Neben der Veränderung der Tight Junctions erhöht auch die durch Zytokine induzierte Apoptose der Epithelzellen die Durchlässigkeit der Epithelbarriere. Dies wird v.a. durch $\text{TNF}\alpha$ mediiert (Schulzke et al. 2006). Hierbei kann $\text{TNF}\alpha$ nicht nur allein durch Bindung an den TNFR1 und Bildung des Complex II die Apoptose einer Zelle einleiten, sondern auch synergistisch mit $\text{IFN}\gamma$ über Caspase 8 und den Jak1/2-STAT -Signalweg den programmierten Tod einer Zelle induzieren (Woznicki et al. 2021).

Um trotz natürlicher Apoptose und Abschilferung der Epithelzellen die Epithelbarriere aufrecht zu erhalten, ist es nötig, dass die in den Krypten liegenden Stammzellen sich permanent teilen und ausdifferenzieren. Die genau gesteuerte Proliferation der Zellen kann unter anderem durch Zytokine beeinflusst werden. $\text{IFN}\gamma$ hatte in Versuchen an T84-Zellen (humane Kolonkarzinom Zelllinie) zeitabhängige Effekte auf die Proliferation mit einer Erhöhung der Zellvermehrung bei kurzzeitiger Inkubation und einer Hemmung bei Langzeitinkubation. Dieser Effekt wurde durch eine gleichzeitige Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$ verstärkt (Nava et al. 2010). Die Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ aus Paneth Zellen in Wistar Ratten hatte ebenfalls eine erhöhte Proliferation der Epithelzellen zur Folge (Seno et al. 2002). Bradford et al. (2017) zeigten, dass eine durch $\text{TNF}\alpha$ erhöhte Proliferation wichtig für die Wundheilung des Epithels ist. Eine erhöhte Proliferation der Epithelzellen in Kombination mit anderen durch eine Entzündung freigesetzten mutagenen Stoffen, wie z.B. Reaktiven Sauerstoffspezies, könnte aber auch ein Grund für das erhöhte Darmkrebsrisiko von IBD-Patienten sein (Tan und Barker 2015; Laredo et al. 2023).

2.6 Chloridsekretion am Darmepithel

Ein Hauptsymptom von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist das Auftreten von Diarrhoe, ausgelöst durch eine verminderte Absorption und gleichzeitig verstärkte Sekretion von Elektrolyten und Wasser am Darmepithel (Wenzl 2012; Gareau und Barrett 2013).

Die Sekretion von Chloridionen über das Darmepithel in das Darmlumen spielt für die Verdauung und den Weitertransport des Darminhaltes eine wichtige Rolle. Parazellulär folgt dem sezernierten Cl^- entlang des entstandenen elektrischen Gradienten zunächst Na^+ und durch das osmotische Ungleichgewicht im Anschluss auch Wasser. Die Chloridsekretion ist also die Triebkraft hinter der Sekretion von Wasser in das Darmlumen und der Mechanismus, über welchen diese reguliert wird. Einer der wichtigsten Transporter für die Aufnahme von aus dem Blutplasma stammenden Cl^- in die Epithelzelle ist der sekundär aktive $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter 1 (NKCC1). Der Ausstrom von Cl^- aus der Epithelzelle in das Lumen kann durch unterschiedliche Anionenkanäle geschehen, wie z.B. den Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). Um diesen Kanal zu aktivieren, muss zuvor eine Kaskade ablaufen, die u.a. durch das Vasoaktive Intestinale Peptid (VIP) oder auch Prostaglandin E_2 (PGE_2) aktiviert werden kann. Die Bindung dieser Stoffe an ihre Rezeptoren aktiviert membranständige Adenylatcyclasen, welche ATP zu cAMP umsetzen. Durch den Anstieg der cAMP-Konzentration werden Enzyme, wie u.a. die Proteinkinase A (PKA), aktiviert, welche daraufhin den CFTR-Kanal phosphorylieren. Durch die Phosphorylierung steigt die Offenwahrscheinlichkeit dieses Anionenkanals und Chlorid kann aus der Zelle entlang des elektrischen Gradienten ins Darmlumen ausströmen (Barrett und Keely 2000).

Auch die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration spielt bei der Sekretion von Chloridionen eine große Rolle. Die Aktivierung der Chloridsekretion über den Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration kann durch verschiedenste Substanzen ausgelöst werden. Zu diesen gehört u.a. Acetylcholin (ACh), der im Darmtrakt wichtigste

parasympathische Neurotransmitter. Die Bindung von ACh an den M₁- oder M₃-Rezeptor einer Darmepithelzelle führt zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Dieses Enzym hydrolysiert das membranständige Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ öffnet IP₃-abhängige Ca²⁺-Kanäle an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER), welches als Ca²⁺-Speicher fungiert, und ermöglicht so den Ausstrom von Ca²⁺ in das Zytosol (Lindqvist et al. 1998). Der Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration aktiviert basolateral Ca²⁺-abhängige K⁺-Kanäle (z.B. KCNN4), sodass K⁺ aus der Zelle ausströmt. Die daraus resultierende Hyperpolarisation der basolateralen Membran erhöht die Antriebskraft für den Ausstrom von Chloridionen über den apikalen cAMP-abhängigen CFTR-Kanal in das Darmlumen (Böhme et al. 1991). Unterstützend wird ein apikaler Ca²⁺-abhängiger Chloridkanal (TMEM16A; transmembrane protein 16) aktiviert (Keely und Barrett 2022).

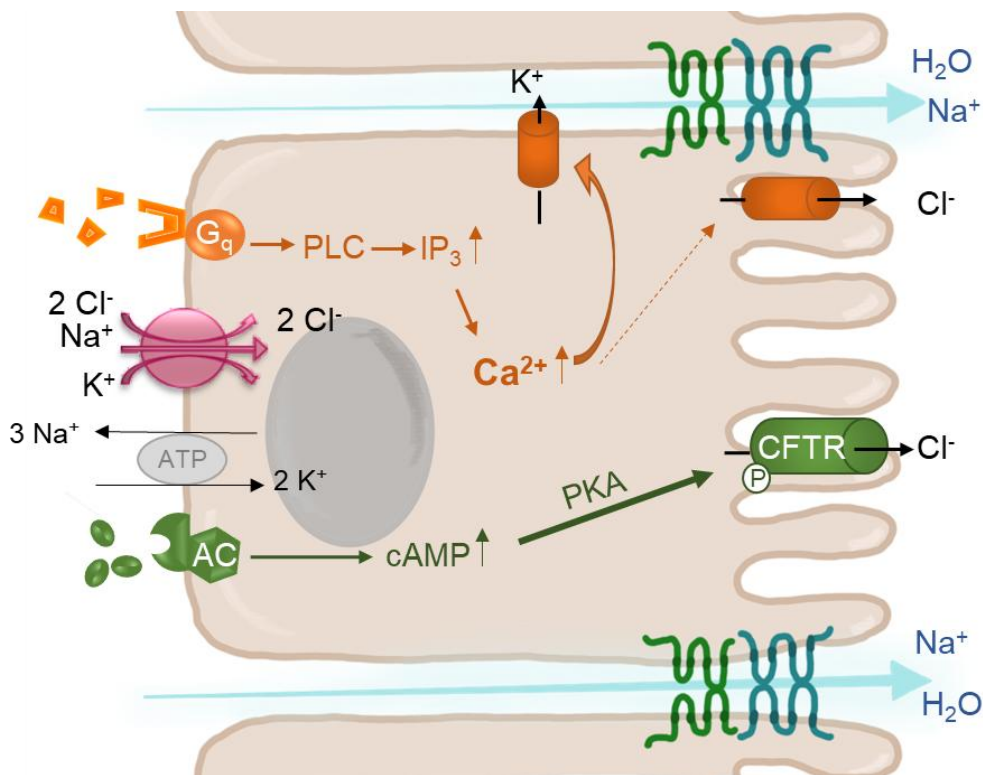


Abbildung 6: Chloridsekretion am Darmepithel

Vereinfachte Darstellung der Chloridsekretion am Darmepithel. Cl^- wird über den Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Cotransporter 1 (NKCC1) in die Zelle transportiert. Die Freisetzung des Second Messengers Ca^{2+} über IP_3 -abhängige Ca^{2+} -Kanäle im ER öffnet apikale Cl^- -Kanäle sowie Ca^{2+} -abhängige, basolaterale K^+ -Kanäle, was durch die darauffolgende Hyperpolarisation der Zelle den Ausstrom von Cl^- in das Lumen erleichtert. Ein Anstieg des Second Messengers cAMP (produziert von der Adenylatcyclase; AC) aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche den Cl^- -Kanal CFTR durch Phosphorylierung öffnet. Der Sekretion von Cl^- folgen parazellulär Wasser und Na^+ .

Frühere, in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Ussing-Kammer-Versuche am Darm von Ratten mit einer durch TNBS induzierten Kolitis zeigten bereits, dass es durch die Entzündung am Darmepithel auch zu Veränderungen der Ca^{2+} -abhängigen Sekretionsprozesse von Chlorid sowohl am Kolon als auch am Jejunum kommt. Die Kinetik der Ca^{2+} -Antwort, induziert durch das Acetylcholinderivat Carbachol, war segmentabhängig verändert. Im Kolon war die Carbachol-induzierte Anionensekretion zeitlich deutlich verkürzt, während sie im Jejunum verlängert war (Becker et al. 2019).

2.7 Ca²⁺-Signaling

Die intrazelluläre Ca²⁺-Homöostase ist eng reguliert, denn Ca²⁺ spielt eine wichtige Rolle als Second Messenger und beeinflusst eine Vielzahl von Prozessen in jeder Zelle des Körpers, so auch in den Epithelzellen des Dünndarms. Wichtig ist hierbei v.a. die zytosolische Ca²⁺-Konzentration sowie das endoplasmatische Retikulum als wichtiger intrazellulärer Ca²⁺-Speicher. Maßgeblich beteiligt an der Regulation der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration sind Ca²⁺-ATPasen in der Plasmamembran (PMCA), die Ca²⁺ unter ATP-Verbrauch aus der Zelle pumpen, sowie Na⁺-Ca²⁺-Austauscher (NCX), die sekundär aktiv Ca²⁺ aus der Zelle transportieren (Matsuda et al. 1997; Wu et al. 2018). Dieser Austauscher findet sich auch am ER wieder, wo er zusammen mit SERCA, der Ca²⁺-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums, Ca²⁺ in das ER befördert und so die intrazellulären Ca²⁺-Speicher füllt.

Ein Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration kann z.B. durch Öffnen von membranständigen Ca²⁺-Kanälen erreicht werden, wofür je nach Zelltyp spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle (VOC) oder Ca²⁺-permeable, nicht selektive Kationenkanäle aus der Familie der TRP (Transient receptor potential) Kanäle verantwortlich sind. Calciumionen können aber auch aus dem ER freigesetzt werden. Dafür sind IP₃-Rezeptoren (IP₃R1, -2 und 3) oder Ryanodinrezeptoren (Typ 1, 2, 3) in der Membran dieser Organelle verantwortlich. Die Entleerung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher wiederum kann zu einem Ca²⁺-Einstrom von extrazellulär führen. Hierbei wird die Entleerung der Ca²⁺-Speicher durch das in der Membran des ER lokalisierte Protein STIM (Stromal interacting molecule) registriert. Daraufhin bildet STIM einen Komplex mit dem in der Zellmembran lokalisierten Protein ORAI (und wahrscheinlich auch anderen Komponenten), die zusammen einen Ionenkanal bilden, durch welchen Ca²⁺ in die Zelle strömen kann. Dieses Zusammenspiel wird als Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) oder kapazitativer Ca²⁺-Einstrom bezeichnet (Clapham 2007; Krebs et al. 2015).

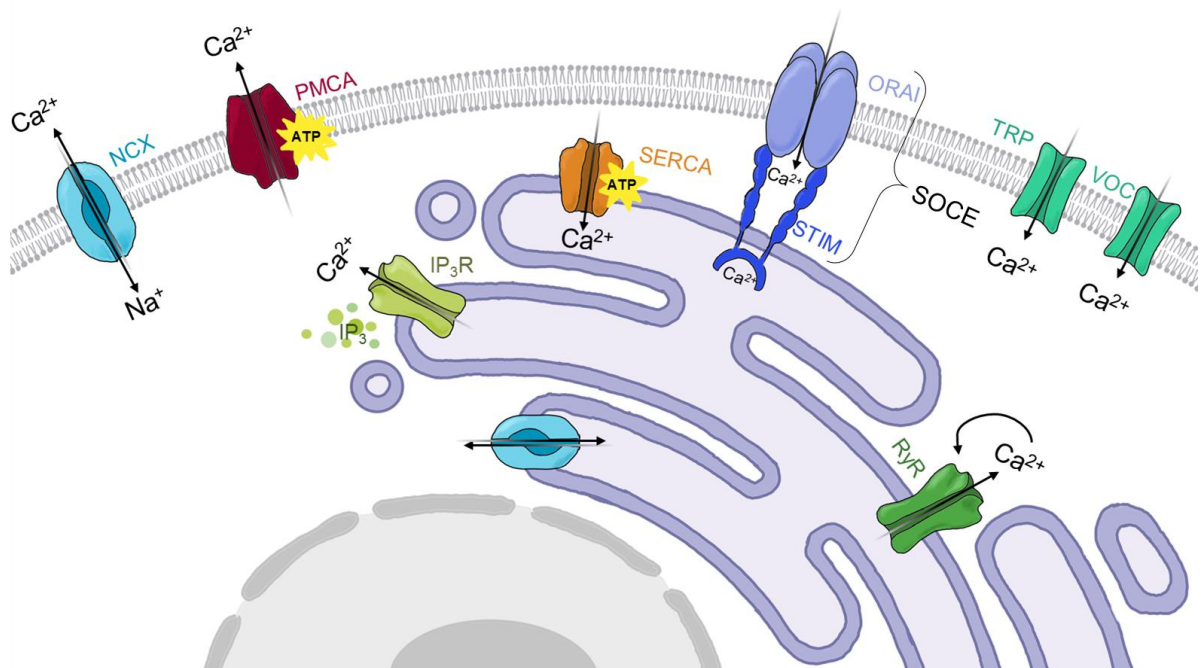


Abbildung 7: Ca^{2+} - Signaling

Die Abbildung zeigt die wichtigsten, an der Ca^{2+} -Homöostase beteiligten Strukturen. Die Ca^{2+} -Pumpen SERCA (Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums) und PMCA (Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase) die Ca^{2+} aktiv aus dem Zytosol in das ER bzw. aus der Zelle pumpen, der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX) an der Zellmembran sowie am ER, der ligandengesteuerte IP_3 -Rezeptor am ER, welcher durch die Bindung von IP_3 (Inositol-1,4,5-trisphosphat) geöffnet wird, der Ryanodinrezeptor (RyR) welcher Ca^{2+} -abhängig öffnet, sowie spannungsabhängige (VOC) Ca^{2+} -Kanäle und TRP (Transient receptor potential) -Kanäle in der Zellmembran. Das Stromal interacting molecule (STIM) bindet abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration im ER an ORAI (Calcium release-activated calcium modulator) und aktiviert so den Store-operated Ca^{2+} -entry (SOCE).

3. Fragestellung der Dissertation

Ziel der Dissertation war es, die Wirkung der bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen hochregulierten proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin 1 β (IL-1 β) und Interferon γ (IFN γ) auf das Darmepithel anhand eines murinen intestinalen Organoidmodells zu untersuchen. Folgende Fragestellungen ergaben sich:

- ❖ Wie beeinflussen die Zytokine die Barrierefunktion des Darmepithels?
- ❖ Hat die Inkubation mit den Zytokinen einen Effekt auf die Funktionalität des Epithels in Bezug auf die Sekretion?
- ❖ Wie ändern sich die Effekte, wenn verschiedene Zytokine gleichzeitig (als „Zytokin-Mix“) auf die Organoide wirken?
- ❖ Welche Zeitabhängigkeit hat die Wirkung von Zytokinen auf Organoide?
- ❖ In wie weit können Organoide, welche mit diesen Zytokinen behandelt wurden, als In-vitro-Modell für entzündliche Prozesse am Darmepithel genutzt werden?

4. Material und Methoden

4.1 Lösungen

Für die Versuche dieses Projekts wurden die folgenden Lösungen verwendet:

4.1.1 Lösungen für die Zellkultur

4.1.1.1 Phosphatpuffersalzlösung (PBS) unsteril

Für die Phosphatpuffersalzlösung wurde eine Tablette PBS in 200 ml Aqua dest. gelöst. Die fertige Lösung enthielt (in mM) 10 (2 mM NaH₂PO₄ + 8 mM Na₂HPO₄) Phosphatpuffer, 2,7 KCl und 137 NaCl.

4.1.1.2 EDTA-Lösung (PBS/EDTA)

Für das Herauslösen der Krypten wurde 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in unsterilem PBS (siehe 4.1.1.1) gelöst.

4.1.1.3 Phosphatpuffersalzlösung (PBS) steril

Das sterile PBS wurde von Carl Roth (ROTI[®]Cell PBS CELLPURE[®] #9143.1; ROTH, Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

4.1.1.4 Phosphatpuffersalzlösung mit Bovinem Serum Albumin (PBS/BSA)

Damit die Organoide nicht an der Pipettenspitze haften, wurde steriles PBS mit 0,1 % Bovinem Serumalbumin (BSA; w/v) versetzt.

4.1.1.5 Organoid-Medium

Das IntestiCult[™] Organoid Growth Medium Mouse wurde von StemCell Technologies (Vancouver, Canada) bezogen. Dieses Medium wurde mit 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (10.000 E/ml Penicillin G, 10 mg/ml Streptomycin-Sulfat in 0,9 % (w/v) NaCl; Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) versetzt.

4.1.1.6 Einfriermedium

Zum Einfrieren wurden die Organoide in einem Einfriermedium resuspendiert, welches zu 80 % (v/v) aus IntestiCult™, zu 10 % (v/v) aus fetalem Kälberserum (FKS; Life Technologies, #10270106) und zu 10 % (v/v) aus sterilem Dimethylsulfoxid (DMSO, #HB3262; BIOZOL, Eching, Deutschland) bestand. Pro Kryoröhrchen wurde 1 ml dieses Einfriermediums verwendet.

4.1.2 Lösungen zum Fixieren und Einbetten

4.1.2.1 Paraformaldehyd (PFA)

Die Organoide wurden in 4 %-iger (w/v) PFA-Lösung für die Anfertigung von Schnitten fixiert. Hierzu wurden 4 g PFA in 100 ml Phosphatpuffer (PB; 4.1.4.1) gelöst, dabei auf 55 °C erhitzt und anschließend filtriert. Die entstandene Lösung wurde aliquotiert und bei -40 °C gelagert.

4.1.2.2 Einbettmedium

Die fixierten Organoide wurden in Gelatine-Blöckchen gegossen. Hierzu wurde eine 10 %-ige (w/v) Gelatine-Lösung mit Aqua bidest. angesetzt und unter ständiger Bewegung auf 40 °C erwärmt.

4.1.3 Lösungen für das Ca²⁺-Imaging

4.1.3.1 Fura-2-Acetoxy-methylester (-AM) -Lösung

Der Fura-2-AM Farbstoff (Thermo Fisher Scientific, #F1201, Dreieich, Deutschland) wurde in DMSO gelöst (1 mg/ml), aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Zum Aufladen der Zellen mit dem Farbstoff für das Ca²⁺-Imaging wurde Standard Tyrode-Lösung (4.1.3.2) mit dem gelösten Fura-2-AM (6 µM) und gleichen Teilen 20 %igem (w/v) Pluronic acid (Thermo Fischer Scientific, #F-127 *20 %, in DMSO gelöst) versetzt. Das Pluronic acid hilft dabei, schlecht lösliche Substanzen in wässrigen Medien zu lösen was die Aufnahme von Fura-2-AM in die Zellen erleichtert (Yates et al. 1992).

4.1.3.2 Standard Tyrode-Lösung

Die calciumhaltige Standard Tyrode war zusammengesetzt aus (in mM): 140 NaCl, 5,4 KCl, 10 HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure), 12,2 Glucose, 1,25 CaCl₂, und 1 MgCl₂. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt mit Hilfe von Salzsäure (HCl, 1 M) und Natriumhydroxid (NaOH, 1 M).

4.1.3.3 Calciumfreie Tyrodelösung

Die calciumfreie Tyrode war zusammengesetzt aus (in mM): 140 NaCl, 5,4 KCl, 10 HEPES, 12,2 Glucose und 1 MgCl₂. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt mit Hilfe von HCl (1 M) und NaOH (1 M).

4.1.4 Lösungen für die Immunfluoreszenz

4.1.4.1 Phosphatpuffer

Der 100 mM Phosphatpuffer (PB) enthielt 20 mM NaH₂PO₄-Lösung und 80 mM Na₂HPO₄ und hatte einen pH von 7,4.

4.1.4.2 Blockinglösung

Die Blockinglösung bestand aus PB, zu welchem 0,2 % (v/v) Triton X-100, 3 % (w/v) BSA und 10 % (v/v) Eselserum (Millipore, Schwalbach, Deutschland) hinzugefügt wurden.

4.1.4.3 Primärantikörper-Lösung

Die Grundlage für die Lösung des Primärantikörpers bildete PB, welchem 0,1 % (v/v) Triton X-100, 0,5 % (w/v) Magermilchpulver (Sucofin, Trade Service International, Reformhaus, Gießen, Deutschland), 1 % (w/v) BSA und 1 % (v/v) Eselserum zugefügt wurden.

4.1.4.4 Sekundärantikörper-Lösung

Die Grundlage für die Lösung des Sekundärantikörpers bildete PB, welchem 0,1 % (v/v) Triton X-100, 0,5 % (w/v) Magermilchpulver und 1 % (w/v) BSA zugefügt wurden.

4.1.5 Lösungen für die 30 min Schwellungsversuche

4.1.5.1 Matrigelbeschichtung

Für die Beschichtung der Plastikpetrischalen wurde Matrigel® im Verhältnis 1:50 (v/v) mit sterilem PBS/BSA (4.1.1.4) verdünnt.

4.1.5.2 Standard Tyrode-Lösung

Für die Live-Cell-Imaging Versuche wurde die gleiche, calciumhaltige Standard Tyrode-Lösung verwendet wie im Ca²⁺-Imaging (siehe 4.1.3.2).

4.1.5.3 Chloridarme Tyrode-Lösung

Die chloridarme Tyrodelösung war zusammengesetzt aus (in mM): 140 NaGluc (Natriumgluconat), 5,4 KCl, 10 HEPES, 12,2 Glucose, 1,25 CaCl₂ und 1 MgCl₂. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt mit Hilfe von NaOH (1 M) und Gluconsäure (50 %; v/v).

4.2 Substanzen

Die Substanzen CaCl₂, Carbachol und Lanthan(III)chlorid (LaCl₃) wurden in destilliertem Wasser gelöst. In 96 % Ethanol gelöst wurden Bumetanid, Indometacin, Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Thapsigargin (biomol, Hamburg, Deutschland, # AG-CN2-0003-M001). Cyclopiazonsäure (CPA) und Fura-2-AM wurden in DMSO gelöst. Die Zytokine (Maus) Tumornekrosefaktor α (# T7539) und Interleukin 1 β (Thermo Fisher Scientific, Gibco™ # PMC0811) wurden in sterilem PBS/BSA gelöst bzw. im Fall von IFN γ (Thermo Fisher Scientific, Gibco™ # PMC4031) damit

verdünnt. Carbachol sowie PGE₂ wurden vor Zugabe nochmals mit dem entsprechenden Puffer verdünnt. Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurden die Substanzen von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

4.3 Tiere und Präparation der Organoide

Für dieses Projekt wurden Segmente des Dünndarms von 5 - 9 Tage alten C57BL6/J Mäusen beider Geschlechter verwendet. Die Tiere wurden in der Zentralen Versuchstierhaltung (ZVTH) der Justus-Liebig-Universität Gießen gezüchtet und bei einer Standardtemperatur von 23 - 25 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 55 % mit einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12:12 h gehalten. Die Versuche (Tötung und Organentnahme) wurden durch die Tierschutzbeauftragten der Justus-Liebig-Universität (Meldungen 679_M und 879_M) genehmigt.

Nach der Euthanasie der Mäuse durch Dekapitation und Eröffnen des Abdomens wurde das Darmkonvolut entnommen und in eine Glaspetrischale mit kalter Phosphatpuffersalzlösung (PBS) gegeben. Der Darm wurde vorsichtig vom Gekröse getrennt und Duodenum, Colon sowie Caecum wurden abgetrennt und verworfen. Im Anschluss wurde der Dünndarm vorsichtig longitudinal eröffnet und gewaschen. In einer zweiten Glaspetrieschale mit kaltem PBS wurde dieser dann mit einem Skalpell in kleine, ca. 2 mm große Stücke zerschnitten. Die Darmstücke mit PBS wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen auf Eis überführt. Das Gefäß wurde geschüttelt und anschließend ca. 1 min auf Eis gestellt, sodass die Darmfragmente absinken konnten. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig dekantiert. Die Darmstücke wurden erneut mit 10 ml kaltem PBS aufgespült und der Überstand nach dem Absinken wieder dekantiert. Dies wurde wiederholt bis der Überstand klar war (ca. 10 bis 15 Mal). Nun wurden 25 ml einer Ca²⁺-Chelatorlösung (2 mM EDTA in PBS; 4.1.1.2) zu den Darmstücken gegeben, um die Krypten, in welchen sich die Stammzellen befinden, aus den Darmfragmenten herauszulösen. Das Zentrifugenröhrchen wurde kurz geschüttelt

und auf Eis für 20 min auf einem Schüttler (Polymax 1040, Heidolph, Schwabach, Deutschland) geschwenkt (40 rpm). Während dieser Inkubation mit EDTA wurde die Suspension alle 5 min nochmals per Hand kurz aufgeschüttelt. Nach 20 min wurde optisch kontrolliert, ob sich bereits ausreichend Krypten bzw. vereinzelte (Stamm-) Zellen in der Suspension befanden. Falls dies nicht der Fall war, wurde die Inkubationszeit um maximal 10 min verlängert.

Der weitere Ablauf fand steril unter einer Laminar Flow Werkbank statt. Die Kryptenfragmente wurden ab diesem Schritt ausschließlich mit steriler 0,1 % (w/v) PBS/BSA-Lösung (4.1.1.4) aufgeschwemmt. Das BSA war nötig, um das Anhaften einzelner Zellen oder kleiner Fragmente an der Wand der Pipettenspitze zu verhindern.

Nach dem Absinken wurde der EDTA-haltige Überstand dekantiert und 10 ml frische, kalte PBS/BSA-Lösung wurde hinzugegeben. Diese Lösung wurde 3 Mal mit einer 10 ml Einmalpipette auf- und abpipettiert. Nach 30 Sekunden wurde der kryptenhaltige Überstand mit derselben Pipette abgenommen und durch ein 70 µm Zellsieb (Cell Strainer, Corning[®], New York, USA) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, um größere Gewebefragmente zu entfernen. In diesem Zentrifugenröhrchen befand sich nun Fraktion 1, welche direkt auf Eis gestellt wurde. Die Darmstückchen wurden erneut mit 10 ml PBS/BSA aufgeschwemmt und der Vorgang so für Fraktion 2 - 4 wiederholt. Von jeder Fraktion wurden einige Mikroliter entnommen, um diese unter dem Lichtmikroskop (Hund Wilovert S, Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland) bewerten zu können. Eine Fraktion mit wenig Debris und vielen Zellen wurde ausgewählt und für 5 min bei 1400 rpm (290 g) zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5702, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland). Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttelt und verworfen. Das Zellpellet wurde mit 10 ml PBS/BSA resuspendiert und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. In diesem wurde die Zelllösung erneut zentrifugiert (1300 rpm (260 g) für 5 min) und der Überstand anschließend verworfen. Das Organoid-Wachstumsmedium IntestiCult[™] wurde zugegeben und das Pellet damit resuspendiert. Dabei richtete sich das zugegebene Volumen nach der Anzahl der benötigten Wells für die jeweiligen Versuche.

Eisgekühltes Matrigel® (#356231, growth-factor reduced, Corning®) wurde mit gekühlten Pipettenspitzen hinzugegeben, sodass ein 1:1 Verhältnis von Medium:Matrigel erreicht wurde. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde das Matrigel mit der Zellsuspension vermischt, ohne Luftblasen in die Suspension zu bringen. Nun wurden ca. 50 µl große Tropfen der Zellsuspension in je ein Well der vorgewärmte 24-Well-Platte (Corning® Costar®, # 3526) pipettiert, bzw. 25 µl große Tropfen in eine 48-Well-Platte (Corning® Costar®, # 3548). Die Platte mit den Matrigeltropfen kam anschließend für mind. 30 min in den warmen Inkubator (Selutec Teco 10; 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ Atmosphäre), damit das Matrigel sich verfestigen konnte. Während des Aushärtens wurde IntestiCult™-Medium in einem Heizblock (Dual-Blockthermostat Carl Roth (YC47.1)) auf 37 °C erwärmt. Dies verhinderte, dass sich das Matrigel durch eine zu niedrige Temperatur wieder verflüssigte, wenn das Medium auf die Tropfen gegeben wurde (500 µl Medium auf 50 µl Matrigel® bzw. 250 µl Medium auf 25 µl Matrigel®). Die restlichen Wells wurden mit etwas sterilem Aqua bidest. gefüllt, um das Verdunsten des Mediums zu verhindern.

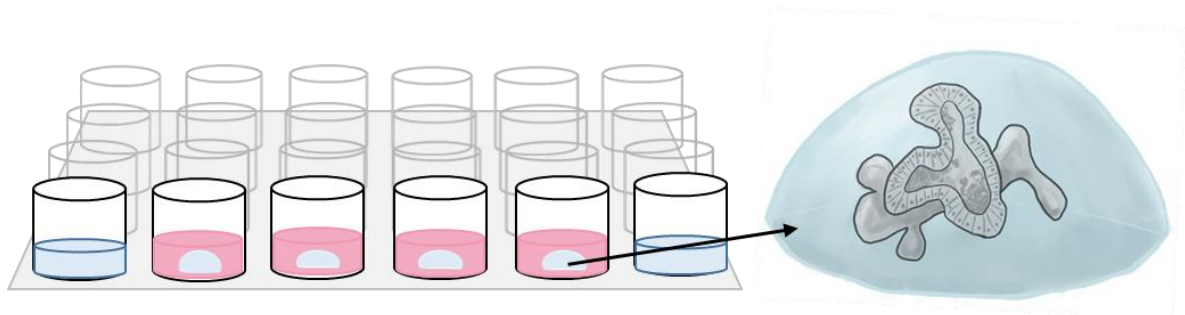


Abbildung 8: 24-Well Platte mit Matrigeltropfen

4.4 Kultivierung der Organoide

4.4.1 Passagieren

Die Organoide wurden passagiert, sobald sich ihr Lumen mit apoptotischen und abgeschilferten Zellen füllte und dadurch unter dem Lichtmikroskop schwarz erschien. Dies war alle 5 - 7 Tage der Fall. Je nach Dichte der Organoide und Anzahl der benötigten Wells für die verschiedenen Experimente wurde im Verhältnis 1:4 oder 1:6 Wells passagiert. Die Platte wurde ca. 2 h vor dem Passagieren im Inkubator (37 °C) erwärmt und die benötigte Menge an Matrigel® wurde vor dem Passagieren auf Eis aufgetaut.

Das Medium wurde abgenommen und 1000 µl kaltes PBS/BSA hinzugegeben. Durch schnelles Auf- und Abpipettieren wurde das Matrigel® aufgelöst und die Organoide mechanisch aufgebrochen. Die Lösung wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Wells wurden noch weitere 2 bis 3 Mal mit je 1000 µl PBS/BSA nachgespült, bis makroskopisch kein Matrigelrest mehr erkennbar war. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 260 g (1300 rpm) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet mit IntestiCult™ (Raumtemperatur) resuspendiert und dem gleichen Volumen an Matrigel® versetzt. Alle weiteren Schritte erfolgten wie unter 4.3 beschrieben.

Das Medium wurde alle 2 - 3 Tage gewechselt. Hierzu wurde es zuvor auf 37 °C erhitzt, das alte Medium abgenommen und neues, warmes IntestiCult™ Medium in jedes Well gegeben (500 µl/Well einer 24-Well-Platte und 250 µl/Well einer 48-Well-Platte). Für Versuche mit Zytokinen wurden TNF α (100 ng/ml), IL-1 β (20 ng/ml) und IFN γ (100 pg/ml) alleine oder als Mix in den entsprechenden Konzentrationen für jeweils 1, 3 oder 5 Tage (d) in das Medium gegeben.

4.4.2 Einfrieren und Auftauen

4.4.2.1 Einfrieren

Um die Organoide länger zu lagern, wurden sie eingefroren. Hierzu wurde die gewünschte Anzahl an Matrigeltropfen vorsichtig in kaltem PBS/BSA gelöst und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Die Suspension wurde für 5 min bei 260 g (1300 rpm) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet mit Einfriermedium (4.1.1.6) resuspendiert (1 ml Einfriermedium/Kryoröhrchen) und in ein Kryoröhrchen überführt. Das Kryoröhrchen wurde in einer Gefrierbox mit Isopentanol (Mr. Frosty, Thermo Fisher Scientific) langsam auf -80 °C gekühlt. In diesem Zustand konnten die Zellen mindestens für 6 - 12 Monate aufbewahrt werden.

4.4.2.2 Auftauen

Um eingefrorene Organoide zu reaktivieren, wurden die Kryoröhrchen bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt, mit 5 ml PBS/BSA aufgefüllt, bei 260 g (1300 rpm) für 5 min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde mit ca. 4 ml PBS/BSA-Lösung resuspendiert und gewaschen. Die Zelllösung wurde erneut bei 260 g (1300 rpm) für 5 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nun wurde das Zellpellet wie unter 4.3 beschrieben mit Medium resuspendiert und durch Zugabe von Matrigel® neue Tropfen in eine vorgeheizte Well-Platte gegeben. Die Tropfen wurden für mind. 30 min im Inkubator bei 37 °C ausgehärtet, bevor warmes IntestiCult™ hinzugegeben wurde. Die restlichen Wells wurden mit etwas sterilem Aqua bidest. befüllt. Nach 1 - 2 d hatten sich neue Organoide gebildet, welche etwa 1 Woche wuchsen, bevor sie erneut passagiert wurden.

4.5 Ca²⁺-Imaging mit Fura-2-AM

4.5.1 Prinzip des Ca²⁺-Imaging

Mit Hilfe des Ca²⁺-Imaging können Änderungen der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration gemessen werden. Dies kann Aufschluss über intrazellulär ablaufende Vorgänge geben, da Ca²⁺ ein weit verbreiteter Second Messenger ist (Berridge 1997). Im Darm ist Ca²⁺ z.B. als Second Messenger an der Signaltransduktion der Chloridsekretion beteiligt.

Zur Messung wurde der Ca²⁺-sensitive Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2-AM) genutzt. Fura-2-AM ist lipophil und gelangt über Diffusion in die Epithelzellen. Dort werden die Acetoxymethylgruppen durch intrazelluläre Esterasen hydrolytisch vom Farbstoff abgespalten. Das so entstehende Fura-2 kann die Zelle nicht mehr verlassen, da es aufgrund seiner Ladung seine lipophile Eigenschaft verloren hat. Fura-2 gehört zur Gruppe der sogenannten „wave-length shifting“ Farbstoffe. Die optimale Wellenlänge, mit der seine Fluoreszenz angeregt werden kann, verschiebt sich von 380 nm bei Ca²⁺-freiem Fura-2 zu 340 nm, wenn das Fura-2 Ca²⁺ bindet. Durch eine Verhältnismessung der Emission bei Anregung mit 340 nm und 380 nm (und Abzug der Hintergrundfluoreszenz) können Konzentrationsänderungen des im Zytosol vorhandenen Second Messengers Ca²⁺ bestimmt werden. Diese räumliche und zeitliche Darstellung der Konzentrationsänderungen lässt wiederum Rückschlüsse auf intrazellulär ablaufende Prozesse zu (Grynkiewicz et al. 1985; Hideharu und Haruo 1994).

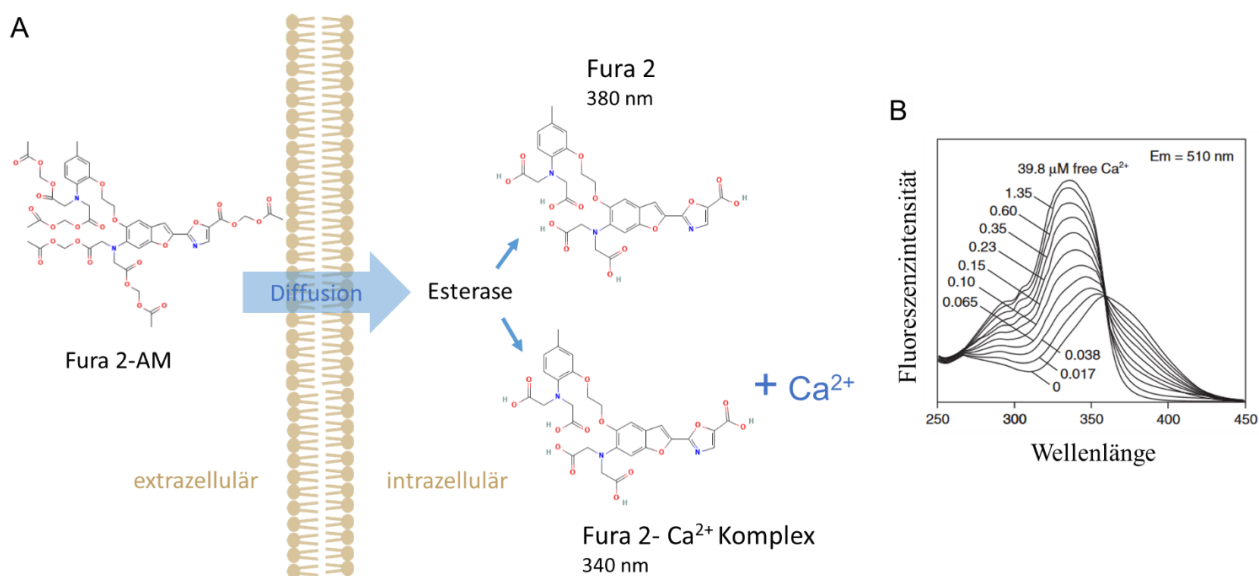


Abbildung 9: Fluoreszenzfarbstoff Fura-2

Aufnahme und Hydrolyse von Fura 2-Acetoxy-methylester (-AM) (A) sowie Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Anregungswellenlänge und Ca²⁺-Konzentration (B). Abbildung modifiziert nach Thermo Fischer Scientific; Strukturformeln: PubChem CID 3364574 und 57054.

4.5.2 Messstand

Die Messungen wurden an einem Olympus IX81 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland), das mit einer Klimakammer verbunden war (Evotec AUC04/B, Evotec, Hamburg, Deutschland), durchgeführt. Die Temperatur um das Mikroskop wurde konstant bei 37 °C gehalten mit einer Luftfeuchtigkeit von 50 %. Die Belichtung erfolgte mit einer Xenonlampe (Brenner: Olympus MT-20L), über ein Filterrad konnte die Anregungswellenlänge innerhalb weniger Millisekunden verändert werden. Der Brenner ist über ein Glasfaserkabel mit einem vorgeschalteten Kondensator am Mikroskop verbunden. Die Aufnahmen wurden mit einer CCD Kamera (Olympus Fire Wire™ (V2.1.30)) angefertigt. Sowohl die Kamera als auch das Mikroskop, der Brenner und die Klimakammer wurden über einen angeschlossenen Computer gesteuert (Olympus xcellence rt software, version 2.0.1; Incubator Control Version 1.2.0.3, Evotec Technologies GmbH).

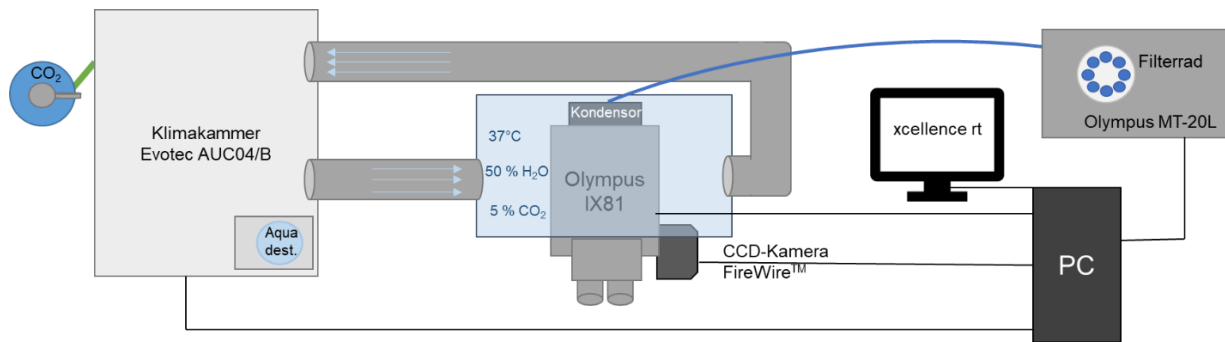


Abbildung 10: Setup für Live-Cell-Imaging Versuche

4.5.3 Durchführung

Zu Beginn der Ca²⁺-Imaging-Versuche wurden spezielle Petrischalen mit Glasboden (MatTek, Ashland USA), welcher für die verwendeten Anregungswellenlängen durchlässig ist, mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml, 70,000–150,000 kDa, Cell Systems, Troisdorf Deutschland) beschichtet. Hierzu wurden 50 µl des Poly-L-Lysins möglichst zentral auf den Glasboden pipettiert und die Petrischale auf ca. 40 °C erwärmt, um das Verdunsten des Poly-L-Lysins zu beschleunigen. So vorbereitet waren die Petrischalen ca. 2 Wochen im Kühlschrank haltbar.

Die Organoide wurden vorsichtig mit kaltem PBS/BSA aus dem Matrigel[®] gelöst, in ein 15 ml Zentrifugengefäß überführt und anschließend bei 200 g (1000 rpm) für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, sodass noch etwa 100 - 150 µl in dem Gefäß verblieben, um das Organoid-Pellet zu resuspendieren. Von dieser Zellsuspension wurden ca. 30 µl zentral auf die Poly-L-Lysin-beschichteten Petrischalen pipettiert. Es schloss sich eine 10-minütige Inkubation im Kühlschrank an, um die Organoide absinken zu lassen. Im Anschluss wurden die Organoide durch Zugabe von ca. 250 µl Fura-2-AM-Lösung (6 µM; 4.1.3.1) für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgeladen. Nach einer Stunde wurde die Lösung vorsichtig abgenommen und einmal vorsichtig mit 250 µl des jeweiligen Puffers gewaschen. Nun wurde die Petrischale mit 4 ml des gewünschten Puffers gefüllt und in eine Halterung am Mikroskop geklemmt.

Bei geringer Belichtung wurde ein intaktes Organoid ausgesucht und die Aufladung mit Fura-2 überprüft. Einzelne Epithelzellen wurden als Region of interest (ROI) markiert, genauso wie auch der Hintergrund als Leerwert als ein ROI markiert wurde. Nun wurde das Messprotokoll gestartet: Bei einer Belichtungszeit von 20 ms wurden die Organoiden alle 5 s mit Licht bei 340 nm und 380 nm Wellenlänge angeregt und die entstehende Fluoreszenzemission gemessen. Das Verhältnis der Emission bei Anregung mit 340 nm und 380 nm (Fura-2 Ratio) wurde als Kurve aufgezeichnet (Olympus xcellence rt software, version 2.0.1).

Nachdem die Baseline für mindestens 3 min stabil war, wurde Carbachol (50 μ M) hinzugegeben. Carbachol, ein stabiles Acetylcholinderivat, ist ein Parasympathomimetikum und löst in Epithelzellen des Darms durch die Bindung an muskarinerge Rezeptoren einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels aus (Schultheiss et al. 2000). Nach Abklingen des durch die erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration angestiegenen Fura-2 Ratio-Signals wurde 10 - 15 min später Cyclopiazonsäure (CPA, 5 μ M) als Vitalitätskontrolle zugegeben. Cyclopiazonsäure hemmt die Ca^{2+} -ATPase in der Membran des endoplasmatischen Retikulums und wirkt als sogenannter SERCA-Blocker (Bischof et al. 1995). Es verhindert den Rücktransport von Ca^{2+} in das endoplasmatische Retikulum und erhöht so die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration. Anschließend wurde die Messung beendet.

Die Messungen wurden mit unbehandelten Organoiden (= Kontrollen) und mit Organoiden, welche mit proinflammatorischen Zytokinen inkubiert worden waren, durchgeführt. Kontrollorganoiden und Versuchsorganoiden stammten aus der gleichen Passage und wurden am gleichen Tag gemessen.

4.5.4 Auswertung der Ca²⁺-Imaging Daten

Der durch Carbachol oder CPA induzierte maximale Anstieg des Fura-2-Signals wurde gemessen und als Differenz zur Baseline, welche über 1 min direkt vor Zugabe der jeweiligen Substanz gemittelt wurde, ausgedrückt (Δ Fura-2 Ratio). Nur wenn eine Änderung der Fura-2 Ratio einen absoluten Wert von $> 0,1$ hatte und zudem größer war als die vierfache Standardabweichung der Fura-2-Messwerte während der Baseline, wurde die Antwort ausgewertet („Responder“-Zellen). Zellen, die nicht mit solch einem Signal auf die Carbacholzugabe, jedoch auf CPA reagierten, wurden als „Non-Responder“ klassifiziert. Zellen, die weder auf Carbachol noch auf CPA mit einer diese Kriterien erfüllenden Ca²⁺-Antwort reagierten, wurden als nichtvital betrachtet und von der weiteren statistischen Analyse ausgeschlossen.

4.6 Fixieren und Einbetten der Organoide für Färbungen

Um Schnitte der Organoide anzufertigen, wurden fixierte Organoide in Gelatine-Blöcke gegossen. Hierzu wurden möglichst viele Organoide gesammelt und fixiert (mind. 4 - 6 Wells). Die Kultivierung der Organoide fand daher für diesen Zweck in 24-Well-Platten statt.

Das Medium wurde von den Matrigeltropfen abgenommen und zu jedem Tropfen je 2 ml einer warmen (37 °C), 4 %-igen (w/v) PFA-Lösung in PBS gegeben. Diese fixierte die Organoide für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Lösung abpipettiert und jedes Well 2 Mal mit je 1 ml warmem PBS gewaschen. Dann wurde je 1 ml kaltes PBS/BSA in jedes Well pipettiert, um die Organoide vorsichtig aus dem Matrigel[®] herauszulösen und in ein 15 ml Zentrifugengefäß zu überführen. Die Wells wurden mehrfach mit PBS/BSA nachgespült, um alle Organoide einzusammeln. Nachdem die Organoide 3 min abgesunken waren, wurde der Überstand bis auf 500 μ l abgenommen. Das Organoidpellet wurde kurz resuspendiert und in ein 1,5 ml

Eppendorfgesäß transferiert. Nachdem dort die Organoide erneut abgesunken waren (nach ca. 3 min), wurde der Überstand so weit wie möglich abpipettiert und verworfen.

Um die Organoide in Blöckchen zu gießen, wurde eine 10 %ige (w/v) Gelatine-Lösung mit Aqua bidest. angesetzt und auf ca. 40 °C erwärmt (4.1.2.2). Das Pellet mit Organoiden wurde in ca. 300 µl der Gelatine gelöst, resuspendiert und zügig in ein Förmchen gefüllt. Als Förmchen diente hier eine mit Parafilm umwickelte Plexiglasplatte, auf die ein 3 mm hoher Plastikring mit einem Durchmesser von 1 cm gepresst wurde. Nachdem der Ring gefüllt worden war, wurde eine zweite, mit Parafilm umwickelte Plexiglasplatte auf die Öffnung gepresst und das Ganze mit einer Schraubzwinde fixiert. Das Förmchen wurde an einem Motor befestigt und unter ständiger Rotation für 30 min bei -20 °C abgekühlt. Die Rotation verhinderte das Absinken der Organoide vor dem Erkalten der Gelatine. Anschließend wurde das Gelatine-Blöckchen aus der Form geschnitten und mit Parafilm und Alufolie umwickelt bei -80 °C gelagert.

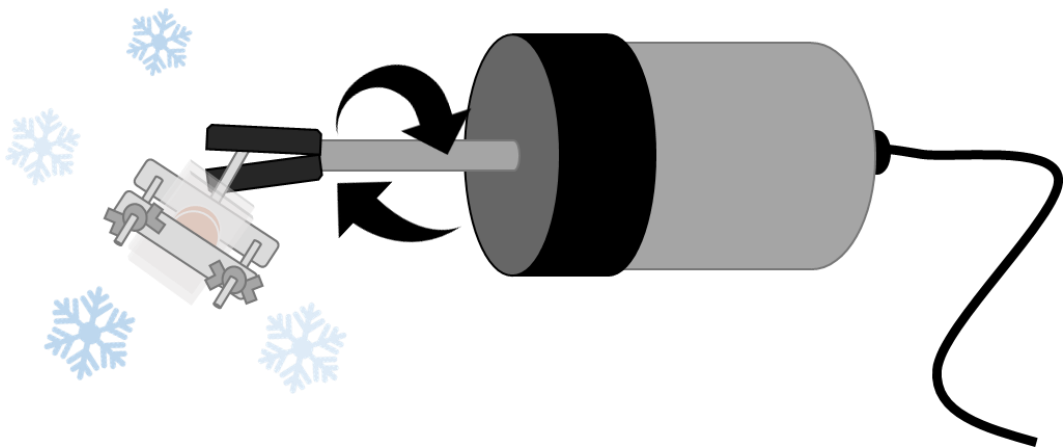


Abbildung 11: Rotation der Gelatineblöckchen

4.7 Immunfluoreszenzfärbungen

4.7.1 Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenz werden Antigene, meist Proteine, mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Bei der indirekten Immunfluoreszenz kommt ein Primärantikörper, der spezifisch an das Antigen bindet, und ein Sekundärantikörper, der an die konstante Region (Fc-Fragment, C-Terminus) des Primärantikörpers bindet, zum Einsatz. Nur der Sekundärantikörper ist hierbei mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Mehrfaches Waschen zwischen der Inkubation mit den Antikörpern gewährleistet, dass nur die Antikörper, die in einem Antigen-Antikörper-Komplex gebunden sind, auf dem Probenmaterial verbleiben und am Ende detektiert werden können.

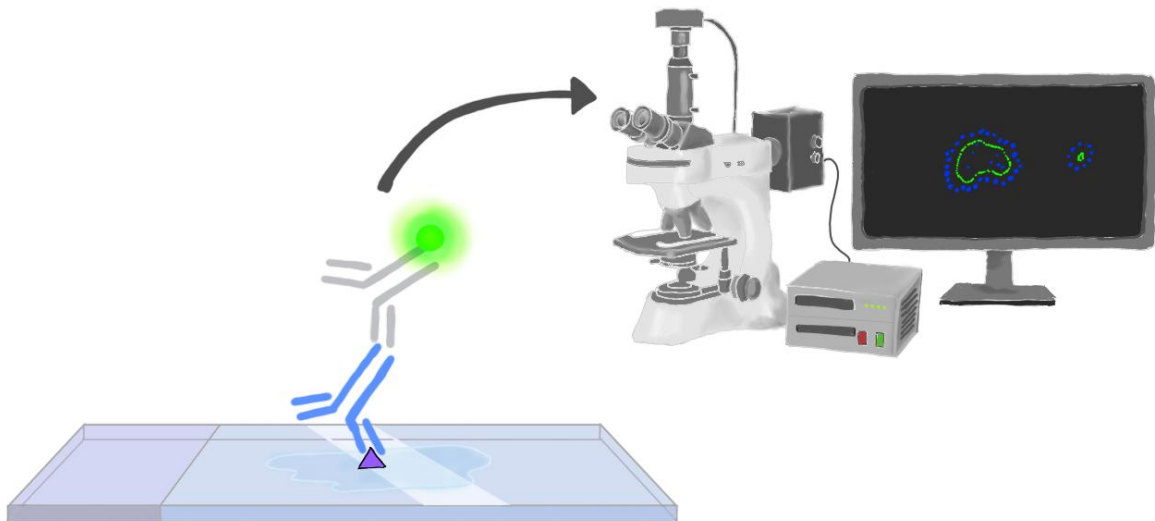


Abbildung 12: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz

4.7.2 Durchführung

Für Immunfluoreszenzversuche wurden die Organoide wie bereits beschrieben (4.6) mit 4 % PFA (w/v) fixiert, in 10 %-ige Gelatine (w/v) eingebettet und die entstandenen Blöckchen eingefroren. Aus diesen Blöckchen wurden anschließend mit einem Kryostaten (Leica CM3050 S, Leica, Wetzlar, Deutschland) 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht (Superfrost® Plus, Thermo Fisher Scientific). Die Schnitte wurden anschließend 3 Mal für je 5 min in Phosphatpuffer (PB) gewaschen um sie zu rehydrieren. Danach wurde die Blockinglösung (4.1.4.2) aufgetragen und das Ganze in einer feuchten Kammer 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Primärantikörper-Lösung (4.1.4.3) mit dem entsprechenden Antikörper (Tabelle 1) auf die Schnitte pipettiert und diese über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut 3 Mal für 5 min in PB gewaschen um Reste des Primärantikörpers zu entfernen. Nun wurde die Sekundärantikörper-Lösung (4.1.4.4) mit dem jeweiligen 2. Antikörper (Tabelle 1) aufgetragen und für eine 1 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt in einer feuchten Kammer inkubiert. Am Ende wurden die Schnitte erneut 3 Mal für 5 min mit PB gewaschen. Als Eindeckmedium und zur gleichzeitigen Färbung der Zellkerne mit DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindoldilactat) wurde Roti®-Mount FluorCare DAPI (Carl Roth, # HP20.1) verwendet. Zeitgleich wurden Negativkontrollen mit dem gleichen Protokoll durchgeführt, bei denen jedoch der jeweilige Primärantikörper weggelassen wurde. Die Schnitte wurden unter einem Nikon 80i Fluoreszenzmikroskop betrachtet und Aufnahmen mit einer DS-2Mv Kamera angefertigt. Es wurden Färbungen von 3 verschiedenen Passagen an Organoiden mit und ohne Zytokin-Inkubation angefertigt.

4.7.3 Auswertung der Apoptoserate

Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen der aktivierten Caspase 3 wurden verblindet ausgewertet. Hierbei wurden alle Zellen im Organoidlumen, die sowohl für das Caspase 3-Signal als auch für DAPI positiv waren, gezählt. Es wurden unbehandelte und 1 d mit TNF α (100 ng/ml) vorbehandelte Organoide von 3 verschiedenen Passagen ausgewertet.

Tabelle 1: Antikörper für die Immunfluoreszenz

Ziel	Tierart	Hersteller	RRID	Verdünnung
Primärantikörper				
aktivierte Caspase 3	Kaninchen	Cell Signaling Technology (9661)	RRID:AB_2341188	1:500
Claudin 3	Kaninchen	Invitrogen (34-1700)	RRID:AB_2533158	1:250
NKCC1	Kaninchen	Proteintech (13884-1-AP)	RRID:AB_2188522	1:500
Villin	Maus	Santa Cruz (sc-58897)	RRID:AB_2304475	1:100
ZO-1	Ratte	Santa Cruz (sc-33725)	RRID:AB_628459	1:100
Sekundärantikörper				
Alexa 488 rabbit IgG	Ziege	Invitrogen (A-11008)	RRID:AB_143165	1:250
Alexa 488 mouse IgG	Esel	Invitrogen (A-21202)	RRID:AB_141607	1:250
Cy3 rat IgG	Esel	Jackson Immuno Research (712-165-150)	RRID:AB_2340666	1:500
Cy3 rabbit IgG	Esel	Jackson Immuno Research (711-165-152)	RRID:AB_2307443	1:1000

RRID: Research Resource Identifier

4.8 Histologische Färbungen

Für die Anfertigung histologischer Schnitte wurden die Organoide wie zuvor beschrieben (4.6) fixiert und in Gelatineblöckchen gegossen. Es wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt und vor der weiteren Färbung dreimal für je 5 min in PB rehydriert.

4.8.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Für die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung, welche alle basischen Zellstrukturen (z.B. Zytoplasma, Kollagen) rot färbt und alle sauren Strukturen (z.B. Zellkern, DNA) blau (Chan 2014), wurden die Schnitte für 7 min mit Mayer's Hämatoxylin gefärbt, kurz in Aqua bidest. gewaschen und anschließend vorsichtig unter fließendem Leitungswasser 7 min gebläut. Danach wurden die Schnitte 5 min in 0,1 % (v/v) Eosin, dem 0,01 % (v/v) Eisessig zugefügt wurde, gefärbt. Zum Schluss wurden die Schnitte erneut in Aqua bidest. gewaschen.

4.8.2 Periodic Acid Schiff (PAS)-Färbung

Für die Periodic Acid Schiff (PAS) Färbung, welche insbesondere Zuckerketten (z.B. in Mucinen oder Glykoproteinen) rot färbt (McManus 1948), wurden die Schnitte 10 min in 1 % (w/v) Periodic Acid-Lösung gefärbt und anschließend zweimal für 2 min in Aqua bidest. gewaschen. Danach wurden die Schnitte für 15 min mit der Schiff's Reagenz gefärbt, bevor sie in 35 °C warmen Leitungswasser für etwa 5 min gewaschen wurden. Im Anschluss wurden die Schnitte kurz in Aqua bidest. gespült bevor sie 5 min in Mayer's Hämatoxylin gefärbt wurden, um die Zellkerne blau zu färben. Zuletzt wurden die Schnitte 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut.

4.8.3 Eindeckeln

Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol → 96 % Ethanol → 100 % Isopropanol (v/v)) jeweils für einige Sekunden entwässert. Danach wurden die Schnitte für 3 min in ROTI®Histol gespült

und im Anschluss mit dem ROTI[®]Histokitt eingedeckelt. Die Reagenzien für die Färbungen wurden von Carl Roth GmbH bezogen. Die Aufnahmen wurden mit dem Mikroskop Nikon 80i und der Kamera DIGITAL SIGHT DS-2MBWc (Nikon Europe, Amstelveen, Niederlande) angefertigt.

4.9 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

4.9.1 Prinzip der qPCR

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA und kann in drei Schritte unterteilt werden (Gibbs 1990). Zunächst findet die Denaturierung statt. Hierbei werden die DNA-Doppelstränge durch das Erhitzen auf 95 °C voneinander getrennt, um Einzelstrang-DNA zu erhalten. Für den nächsten Schritt, die sogenannte Anlagerung, wird die Temperatur auf 65 °C abgesenkt. So können genspezifische Primer an die DNA-Einzelstränge binden. Da zwei komplementäre Einzelstränge entstehen, werden auch zwei entsprechende Primer benötigt. Die Primer binden an das 3'-Ende ihrer jeweiligen Gensequenz, denn der 3. Prozess, die Replikation der DNA-Sequenz durch Anlagerung der komplementären Basen, kann nur von 5' in 3'-Richtung stattfinden. Für die Replikation wird die Temperatur erneut auf 72 °C angehoben, da die DNA-Polymerase dort ihre maximale Effektivität hat. Dieser Zyklus wird 40 Mal wiederholt, um die DNA-Sequenz des gesuchten Gens zu vervielfältigen.

Das besondere an der Real Time (RT-) qPCR ist, dass nicht nur die Expression eines Gens, sondern auch die Quantität direkt bestimmt wird. In diesen Versuchen wurde die TaqMan RT-qPCR durchgeführt. Hierbei bindet eine TaqMan Sonde, bestehend aus einer kurzen, genspezifischen DNA-Sequenz, an die ein Fluorophor und ein Quench-Molekül gebunden sind, an den zu replizierenden DNA-Einzelstrang. Das nahe gelegene Quench-Molekül wirkt als Fluoreszenzlöscher, da es durch die Nähe zum Fluorophor zum „Fluorescence resonance energy transfer“ kurz FRET (Dymond 2013)

– also der Übertragung der Energie des Fluorophors auf das Quench-Molekül – kommt. Wird der Einzelstrang in der Phase der Replikation dupliziert, so wird die Sonde zerstört und das daran gebundene Fluorophor wird von dem Quench-Molekül getrennt. Das entstehende Fluoreszenzsignal kann gemessen werden und ist spezifisch für die Replikation des Gens, da freie, ungebundene Sonden kein Fluoreszenzsignal abgeben können. Wie schnell, also ab welchem Zyklus es zum exponentiellen Anstieg des Fluoreszenzsignals kommt, ist abhängig von der Ausgangsmenge des Gens. Diesen Schwellenzeitpunkt nennt man C_T -Wert (Kubista et al. 2006). Je kleiner dieser Wert, desto mehr DNA des gesuchten Gens war im Ausgangsmaterial. Um C_T -Werte vergleichen zu können, muss die Effizienz, mit der jede Probe vervielfältigt wird, in die Analyse miteinbezogen werden (Karlen et al. 2007). Optimalerweise sollte diese zwischen 1,7 und 2 liegen, wobei 2 bedeuten würde, dass sich die DNA-Menge pro Zyklus verdoppelt. Zur Bestimmung der qPCR-Effizienz wurde die Software LinRegPCR[®] (Version 2021.2; Dr. J. M. Ruijter, Amsterdam UMC, Niederlande) genutzt.

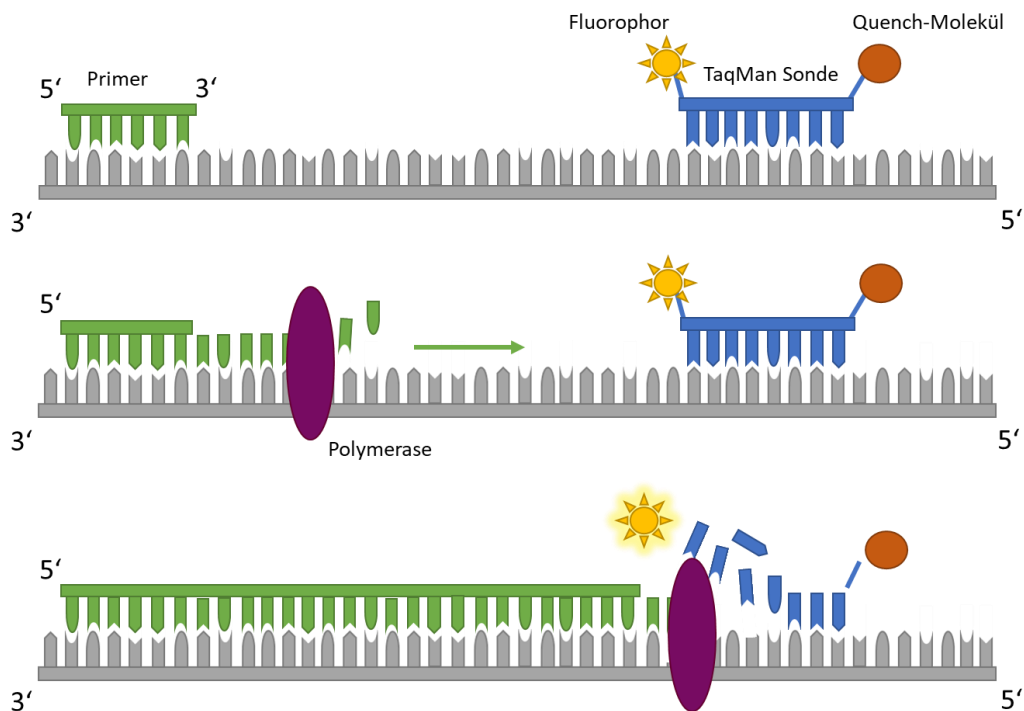


Abbildung 13: Prinzip der TaqMan RT-qPCR

4.9.2 RNA-Isolierung aus Organoiden

Für die qPCR wurden Organoide aus mind. 3 verschiedenen Passagen gesammelt. Hierfür wurden die Organoide mit kalter PBS/BSA-Lösung aus dem Matrigel® gelöst und für 5 min bei 290 g (1400 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen, das Pellet mit 450 µl Lysis buffer resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfgefäß mit einer Metallkugel überführt. In einer Schwingmühle (MM301, Retsch, Haan, Deutschland) wurden die Organoide durch die Metallkugel für 2 min bei 30 Hz homogenisiert. Die Gefäße wurden anschließend kurz zentrifugiert, um der Schaumbildung entgegenzuwirken. Die Lösung konnte nun in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei -80 °C gelagert werden bis alle benötigten Organoide gesammelt werden konnten. Die Isolation der RNA aus den Proben erfolgte anhand des „NucleoSpin RNA Plus protocol“ mit dem RNA Plus Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland), wobei die genomische DNA entfernt wurde. Der RNA-Gehalt und die Reinheit (OD_{260/280}) wurden im Anschluss mit dem Nanodrop One R11 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt und durch Zugabe von RNA-freiem Wasser auf 250 ng/µl eingestellt (gelevelt), sodass eine einheitliche Ausgangsmenge für die cDNA-Gewinnung gegeben war.

4.9.3 Umschreiben in cDNA

Die isolierte RNA muss für die Analyse mittels qPCR durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Für das Umschreiben in cDNA wurde das High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Es wurden pro 1 µl gelevelter RNA 10 µl Puffer, 1 µl Enzym und 8 µl RNase-freies Wasser in ein Eppendorfgefäß gegeben und im Cycler (StepOnePlus, Applied Biosystems, Waltham, USA) umgeschrieben. Hierfür wurde folgendes Programm verwendet: 60 min bei 37 °C, gefolgt von 5 min bei 95 °C, bevor die Proben im Anschluss auf 4 °C abgekühlt wurden. Die cDNA wurde vor der weiteren Verarbeitung bei -40 °C gelagert.

4.9.4 Referenzgene

Als Referenzgene wurden Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (Gapdh, Mm99999915_g1), Ribosomal protein lateral stalk subunit P0 (Rplp0, Mm00725448_s1), Eukaryotic translation elongation factor 2 (Eef2, Mm05700170_g1) und β -Glucuronidase (Gusb, Mm01197698_m1) von Thermo Fisher Scientific sowie Mitochondrial ATP synthase (ATP5B) und 18S von PrimerdesignTM (Eastleigh, UK) geNorm 12 gene kit mouse (Z-ge-SY-12-mo) getestet. Die Gene wurden anhand von Literaturrecherchen (Wang et al. 2010) und Erfahrungswerten aus früheren qPCR-Versuchen an Darmgewebe ausgewählt. Dabei haben sich Gapdh and Gusb als die am stabilsten exprimierten Referenzgene innerhalb und zwischen den Gruppen herausgestellt (Analyse mittels Software: NormFinder[®], MOMA, Aarhus University Hospital, Denmark) und wurden daher im weiteren Verlauf eingesetzt.

4.9.5 Durchführung der qPCR

Es wurde cDNA von unbehandelten Organoiden und Organoiden, die 3 d mit dem Zytokin-Mix (TNF α (100 ng/ml) + IL-1 β (20 ng/ml) + IFN γ (100 pg/ml)) oder 5 d mit TNF α (100 ng/ml) behandelt wurden, von jeweils 3 verschiedenen Passagen untersucht. Die jeweiligen Proben wurden immer als Triplet-Ansatz mit den zwei Referenzgenen (Gapdh und Gusb) und Negativkontrollen pro Platte gemessen. In jedes Well wurden vor Beginn der Messung 3,5 μ l Wasser, 5 μ l TaqMan[®] Gene Expression Mastermix (Thermo Fisher Scientific) und 0,5 μ l Primer (Tabelle 2) sowie 1 μ l der cDNA pipettiert und die Platte im Anschluss kurz abzentrifugiert (mini Plate Spinner 1000, Labnet, Edison, USA). Danach wurde die Platte in den Cyler gegeben und das Protokoll gestartet (Software: StepOneTM v.2.3, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Hierbei wurde die cDNA zunächst 2 min auf 50 °C erwärmt und im Anschluss 10 min bei 95 °C denaturiert. Für die Anlagerung wurde die Temperatur für 1 min auf 60 °C gesenkt und im Anschluss für eine erneute Denaturierung wieder für 15 s auf 95 °C erhöht. Der Zyklus von Denaturierung gefolgt von Anlagerung und Replikation wurde 40 Mal wiederholt.

Tabelle 2: Primer für die qPCR

Zielgen	Assay ID	Gennummer*
Gapdh	Mm99999915_g1	NM_008084.3
Gusb	Mm01197698_m1	NM_010368.1
ZO-1 (Tjp1)	Mm01320638_m1	NM_001163574.1
CFTR	Mm00445197_m1	NM_021050.2
NKCC1 (SLC12A2)	Mm01265951_m1	NM_009194.3
Muc2	Mm01276676_m1	NM_023566.3
I κ b α (Nfkbia)	Mm00477798_m1	NM_010907.2
IP ₃ R1 (Itpr1)	Mm00439907_m1	NM_010585.5
IP ₃ R2 (Itpr2)	Mm00444937_m1	NM_010586.2
IP ₃ R3	Mm01306070_m1	NM_080553.3
SERCA1	Mm01275320_m1	NM_007504.2
SERCA2	Mm01201431_m1	NM_001110140.3
SERCA3	Mm00443898_m1	NM_001163336.1
RyR1	Mm01175211_m1	NM_009109.2
RyR2	Mm00465877_m1	NM_023868.2
RyR3	Mm01328421_m1	NM_177652.2
STIM1	Mm01158413_m1	NM_009287.4
STIM2	Mm01223103_m1	NM_001081103.2
ORAI1	Mm00774349_m1	NM_175423.3
ORAI2	Mm04214089_s1	NM_178751.3
Claudin 1 (Cldn-1)	Mm01342184_m1	NM_016674.4
Claudin 2 (Cldn-2)	Mm00516703_s1	NM_016675.4
Claudin 3 (Cldn-3)	Mm00515499_s1	NM_009902.4
Claudin 4 (Cldn-4)	Mm00515514_s1	NM_009903.2
Claudin 5 (Cldn-5)	Mm00727012_s1	NM_013805.4
Claudin 7 (Cldn-7)	Mm00516817_m1	NM_016887.6
Claudin 8 (Cldn-8)	Mm00516972_s1	NM_018778.3
Claudin 12 (Cldn-12)	Mm01316510_m1	NM_001193659.2

Claudin 18 (Cldn-18)	Mm00517321_m1	NM_001194921.1
G _q Protein alpha (Gnaq)	Mm00492381_m1	NM_008139.5
PLCβ3 (Plcb3)	Mm00476953_m1	NM_001290349.1
TMEM16A (Ano1)	Mm00724407_m1	NM_001242349.1
M ₁	Mm00432509_s1	NM_001112697.1
M ₂	Mm01701855_s1	NM_203491.4
M ₃	Mm00446300_s1	NM_033269.4

*<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

4.9.6 Auswertung der qPCR Daten

Für die Auswertung wurden die Effizienzen, mit der die qPCR abliefen, über LinRegPCR[®] bestimmt und die Baseline-korrigierten C_T-Werte ausgegeben. Anschließend wurden die Proben, welche kein Plateau erreichten oder deren Effizienz mehr als 5 % von der mittleren Effizienz (des jeweiligen Primers) abwichen, verworfen und jeweils ein Mittelwert der C_T-Werte der Triplet-Ansätze berechnet. Jeder Primer wurde auf 2 unterschiedlichen Platten gemessen, um reproduzierbare Ergebnisse sicherzustellen (technisches Replikat). Die Ergebnisse der zwei Platten wurden gemittelt und anschließend mit der Software REST 2009[®] ausgewertet. Die Software arbeitet hierbei mit dem Pair-wised fixed reallocation randomization Test (Pfaffl et al. 2002) und gibt das arithmetische Mittel und das 95 % Konfidenzintervall ausgehend von der Reaktionseffizienz und der Expression aus.

4.10 Schwellungsversuche

4.10.1 Prinzip

Eine Stimulation der Epithelzellen mit Sekretagogen führt zur Chloridsekretion und damit auch zum passiven parazellulären Transport von Kationen und Wasser in das Darm- bzw. in diesem Fall Organoidlumen und lässt die Organoiden anschwellen. Das Ausmaß dieser Schwellung kann genutzt werden, um zu vergleichen, wie stark eine Substanz die Chloridsekretion induziert. Auch der sekretagoge Effekt von Zytokinen kann so quantifiziert werden.

4.10.2 Zeitraffer

4.10.2.1 30 min Aufnahmen

Die Funktionalität des Organoidmodells wurde durch die Messung der Reaktion auf bekannte Sekretagoge getestet. Mit dem schon bei den Ca^{2+} -Imaging-Versuchen verwendeten Live Cell Imaging Setup (Olympus IX81 Mikroskop mit Olympus Fire Wire™ Kamera (V2.1.30) verbunden mit einer Klimakammer (Evotec AUC04/B; 37 °C, 50 % Luftfeuchtigkeit und 5 % (v/v) CO_2 ; Abbildung 10)) wurden Schwellungsversuche über 30 min durchgeführt. Hierfür wurden die Organoiden zunächst mit kaltem PBS/BSA aus dem Matrigel® gelöst, abzentrifugiert und mit einem geringen Volumen PBS/BSA resuspendiert, sodass die Suspension eine hohe Organoiddichte vorwies. Kleine Plastikpetrischalen wurden auf einer Fläche von ca. 1 cm^2 mit 10 μl verdünntem Matrigel® (4.1.5.1) beschichtet. Auf das noch flüssige Matrigel® wurden 10 μl der PBS/Organoidsuspension gegeben. Zum Aushärten kamen die Petrischalen für 10 min in einen Wärmeschrank bei 37 °C. Anschließend wurden 4 ml der warmen Pufferlösung in die Petrischalen gegeben. Diese Versuche wurden mit Standard Tyrode und mit chloridarmer Tyrode-Lösung durchgeführt. Neben unbehandelten Organoiden als Kontrolle wurden einige Organoiden 1 min nach Aufnahmebeginn mit 50 μM Carbachol oder 1 μM PGE_2 behandelt. Alle 30 Sekunden wurde eine Durchlichtaufnahme erstellt. Bei den Messungen mit chloridarmer Tyrode

wurde an jedem Versuchstag als Positiv-Kontrolle eine Aufnahme von Organoiden in Standard Tyrode, behandelt mit 1 μM PGE₂, mit dem Nikon ECLIPSE Ts2R, HAMAMATSU ORCA-spark angefertigt. Da > 83 % der Organoide in diesen zeitabhängigen Kontrollen auf die Stimulation mit PGE₂ mit einer deutlich sichtbaren Schwellung reagierten, konnte die Vitalität der verwendeten „Organoidcharge“ belegt werden.

4.10.2.2 24h Aufnahmen

Auch die Zytokine lösten teilweise eine Schwellung der Organoide aus. Um den zeitlichen Verlauf dieser Schwellung quantifizieren zu können, wurden Langzeit-Durchlichtaufnahmen über 24 h durchgeführt. Hierfür verblieben die Organoide in ihrem Matrigeltropfen und dem Standardmedium IntestiCult™. Für die Aufnahmen wurde auch hier das Live-Cell Imaging Setup genutzt (Abbildung 10). Alle 5 min wurde eine Durchlichtaufnahme gemacht und die Aufnahmen am Ende in ein Video konvertiert (Olympus xcellence rt software, version 2.0.1). Diese Aufnahmen wurden von unbehandelten Organoiden sowie Zytokin-vorbehandelten Organoiden erstellt. Nach 22 h wurde Forskolin (9 μM) zu allen Organoiden gegeben. Forskolin stimuliert die in Darmepithelzellen die cAMP-abhängige Chloridsekretion, was bei allen Organoide zu einer Schwellung führte.

4.10.3 Bumetanid und Indometacin

Um die Ursache der TNF α -induzierten Schwellung der Organoide genauer zu ergründen, wurden Schwellungsversuche nach Vorbehandlung mit Bumetanid, einem Blocker des Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporters (Zhao et al. 2022), und Indometacin, einem Blocker von Cyclooxygenasen (COX; Seibert et al. 1997), welche für die Synthese von Prostaglandinen essenziell sind, durchgeführt. Hierfür wurden Durchlichtaufnahmen der Organoide (im Matrigel®, mit Medium) mit dem Nikon ECLIPSE Ts2R, HAMAMATSU ORCA-spark vor Inkubation angefertigt. Direkt im Anschluss wurden die Organoide mit den jeweiligen Zytokinen in Anwesenheit von Bumetanid (100 μM) oder Indometacin (100 μM) inkubiert. Nach 24 h wurden erneut Aufnahmen der

gleichen Organoide angefertigt. Zeitabhängige Kontrollen wurden mit Ethanol (0,5 % (v/v)), dem Lösungsmittel für Bumetanid und Indometacin, behandelt.

4.10.4 Auswertung der Schwellungsversuche

Um die morphologischen Veränderungen der Organoide quantifizieren zu können, wurde die relative Lumengröße mit Hilfe von ImageJ (1.54f, W. Rasband et al., National Institutes of Health, USA, <http://imagej.org>) bestimmt. Hierfür wurde die Fläche des Organoidlumens gemessen und durch die Gesamtgröße des Organoids dividiert. So konnte der Anstieg der relativen Lumengröße (in Prozentpunkten) ermittelt werden.

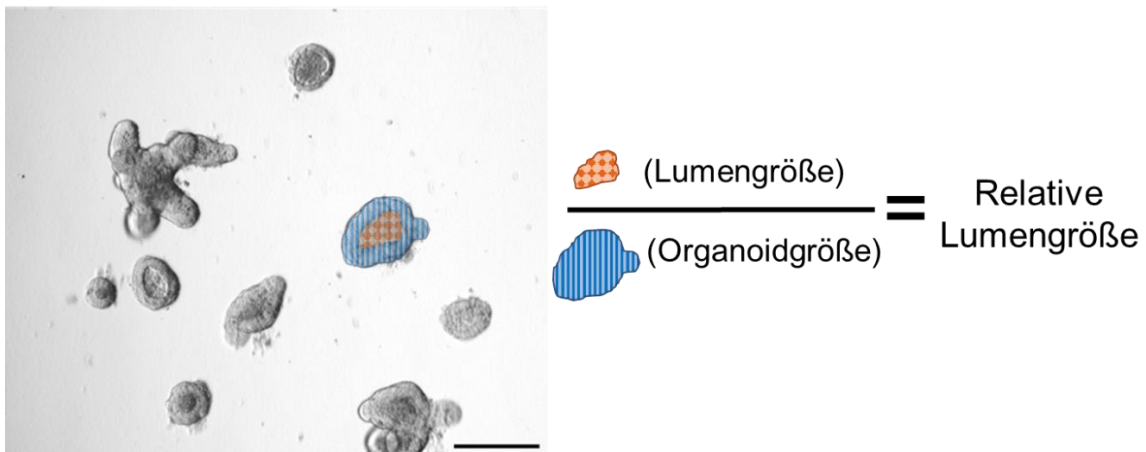


Abbildung 14: Bestimmung der Relativen Lumengröße

Bestimmung der Flächen mit ImageJ; Maßstab = 200 μ m.

Für die Versuche mit Bumetanid und Indometacin wurde die Differenz der relativen Lumengröße vor und 24 h nach Inkubation für 10 Organoide pro Well bestimmt. Um den zeitlichen Verlauf der Schwellung der Zeitraffer-Versuche darzustellen, wurden bei den 24 h-Aufnahmen stündlich Aufnahmen ausgewertet, bei den Kurzzeitversuchen (30 min) alle 2 min. Bei den Kurzzeitversuchen galten Organoide als Responder auf Carbachol und PGE₂, wenn es zu einem Anstieg der relativen Lumengröße um mindestens 10 Prozentpunkte kam.

5. Statistik

Um zwei unabhängige Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Ergab ein vorausgehender F-Test, dass sich die Varianzen der zu vergleichenden Gruppen signifikant (mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$) unterschieden, wurde stattdessen der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, kam eine Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Tukey's Post-hoc-Test zum Einsatz. Um Differenzen zwischen Gruppen mehrerer experimenteller Ansätze zu vergleichen, wurde eine lineare Kontrastanalyse mit Hilfe einer ANOVA gefolgt von einem Scheffé-Test berechnet. Die Ergebnisse werden im Regelfall als Mittelwert \pm Mittlerer Fehler des Mittelwerts (SEM) mit der Anzahl (n) an Zellen bzw. Organoiden dargestellt. Die Streuung (SEM) linearer Kontraste wurde über das Gauss'sche Fehlerfortpflanzungsgesetz berechnet. Lediglich die qPCR-Daten werden als arithmetisches Mittel und 95 % Konfidenzintervall gezeigt, und statistische Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden bei diesen Daten mit dem Pair-wised fixed reallocation randomization Test (REST2009) berechnet (Pfaffl et al. 2002).

Es wurde darauf geachtet, dass alle Messungen an Organoiden aus mindestens drei unterschiedlichen Passagen durchgeführt wurden. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) wurde bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen mit „*“ gekennzeichnet. Bei Mehrgruppenvergleichen mittels ANOVA wurden statistisch homogene Gruppen mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet.

Die lineare Regressionsanalyse der Schwellungsdaten wurde mit GraphPad Prism (5.01) (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) berechnet.

6. Ergebnisse

6.1 Organoidmodell

6.1.1 Morphologische Charakterisierung

Die Organoide zeigten sowohl in der HE- als auch in der PAS-Färbung die typische Morphologie des Darmepithels mit hochprismatischen Enterozyten, einem basal liegenden Zellkern und einer zum Lumen gerichteten apikalen Seite (Abbildung 15). Die PAS-Färbung konnte zudem die Anwesenheit von Becherzellen bestätigen, wobei durch die Inkubation mit TNF α keine deutlichen Unterschiede in der Dichte der Becherzellen erkennbar war.

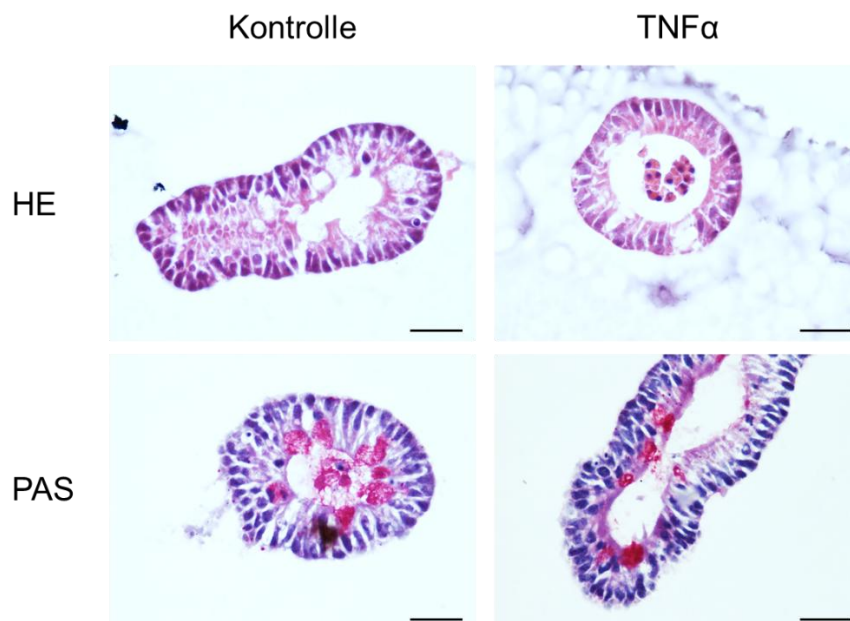


Abbildung 15: HE- und PAS-Färbung

Repräsentative Aufnahmen von Organoiden mit (rechte Spalte) und ohne (linke Spalte) Inkubation mit TNF α (100 ng/ml, 1 d) nach Färbung mit HE (obere Reihe) oder PAS (untere Reihe). Der Maßstab beträgt 25 μ m. Es wurden 3 unabhängige Färbungen von Organoiden aus drei verschiedenen Passagen durchgeführt.

Die Polarisierung der Epithelzellen konnte auch durch die Immunfluoreszenzfärbung von Villin, einem Protein, das in der Bürstensaummembran exprimiert wird (Friederich et al. 1990), bestätigt werden. Das Signal war wie erwartet an der apikalen, dem Lumen zugewandten Zellseite nachweisbar (Abbildung 16). Auch die Tight Junction-Proteine Zonula Occludens-1 (ZO-1) und Claudin 3 (Cldn-3) konnten durch eine Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden (Abbildung 16). Das stärkste ZO-1-Signal war apikal an den Epithelzellen zu sehen, was der Lokalisation in vivo entspricht (Citi et al. 2024). Auch das abdichtende Claudin 3 wurde, wie bereits in der Literatur beschrieben (Capaldo 2023), auf der basolateralen Seite gefunden.

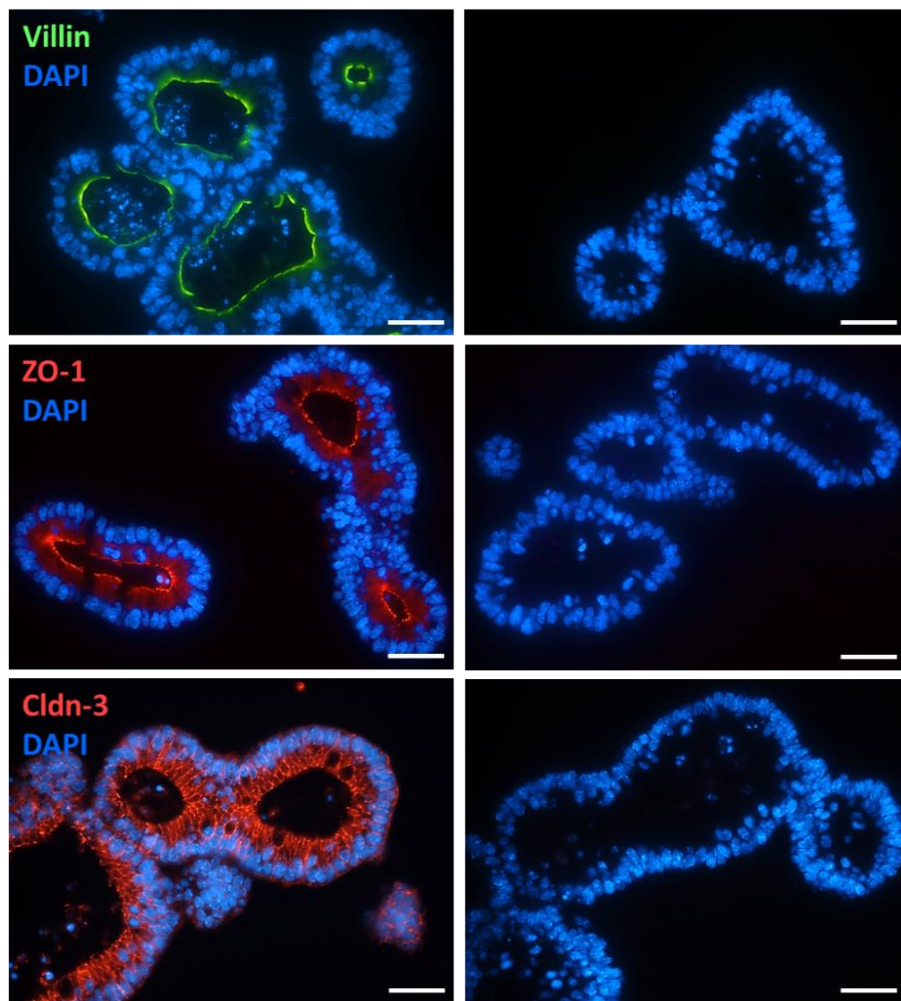


Abbildung 16: Immunfluoreszenz Organoide

Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen von Villin (kombiniert mit Alexa488 mouse IgG), Zonula Occludens-1 (ZO-1; kombiniert mit Cy3 rat IgG) und Claudin 3 (Cldn-3; kombiniert mit Cy3 rabbit IgG) in Dünndarmorganoiden. In der rechten Spalte ist die Negativkontrolle ohne den jeweiligen Primärantikörper zu sehen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab = 20 μ m.

6.1.2 Schwellungsversuche

Die Funktionalität des Organoidmodells wurde durch Schwellungsversuche überprüft. Hierfür wurden die Effekte verschiedener Sekretagoge auf die Organoide getestet. Die Veränderung der relativen Lumengröße (Abbildung 14) wurde bei unbehandelten Organoiden (als zeitabhängige Kontrolle) sowie bei Organoiden, die zu Beginn des Experiments mit Carbachol (50 μ M) oder PGE₂ (1 μ M) stimuliert wurden, über 30 min gemessen. Während die relative Lumengröße der unbehandelten Organoide über die Zeit nur um $1,3 \pm 1,1$ Prozentpunkte ($n = 11$) anstieg, kam es bei der Carbacholgruppe ($17,1 \pm 2,0$ Prozentpunkte; $n = 10$) und der Prostaglandin E₂-Gruppe ($35,4 \pm 4,1$ Prozentpunkte; $n = 10$) zu einer signifikanten Schwellung der Organoide (Abbildung 17 A, B). Die Inkubation mit PGE₂ hatte hierbei einen signifikant stärkeren sekretagogen Effekt auf die Organoide als die Inkubation mit Carbachol ($p < 0,05$). Auch der Anteil der auf die Substanzen reagierenden Organoide war bei PGE₂ mit 83,3 % deutlich höher als bei Carbachol (55,6 %). Die maximale Geschwindigkeit der Schwellung (in %/min; berechnet aus der größten Steigung zwischen 2 Messpunkten) lag in der Kontrollgruppe bei $1,1 \pm 0,1$ %/min und war in der Carbacholgruppe nur insignifikant erhöht auf $3,7 \pm 0,3$ %/min. Im Gegensatz dazu war die maximale Geschwindigkeit der Schwellung in der PGE₂-Gruppe mit $8,5 \pm 1,5$ %/min signifikant höher gegenüber der zeitabhängigen Kontrolle ($p < 0,05$; Abbildung 17 C).

Um festzustellen, ob diese Schwellung wirklich auf eine verstärkte Chloridsekretion zurückzuführen ist, wurden die Versuche in chloridarmer Tyrode wiederholt. Unter diesen Bedingungen war der Carbacholeffekt komplett aufgehoben und der durch PGE₂ induzierte Anstieg der relativen Lumengröße massiv reduziert (Abbildung 17 D).

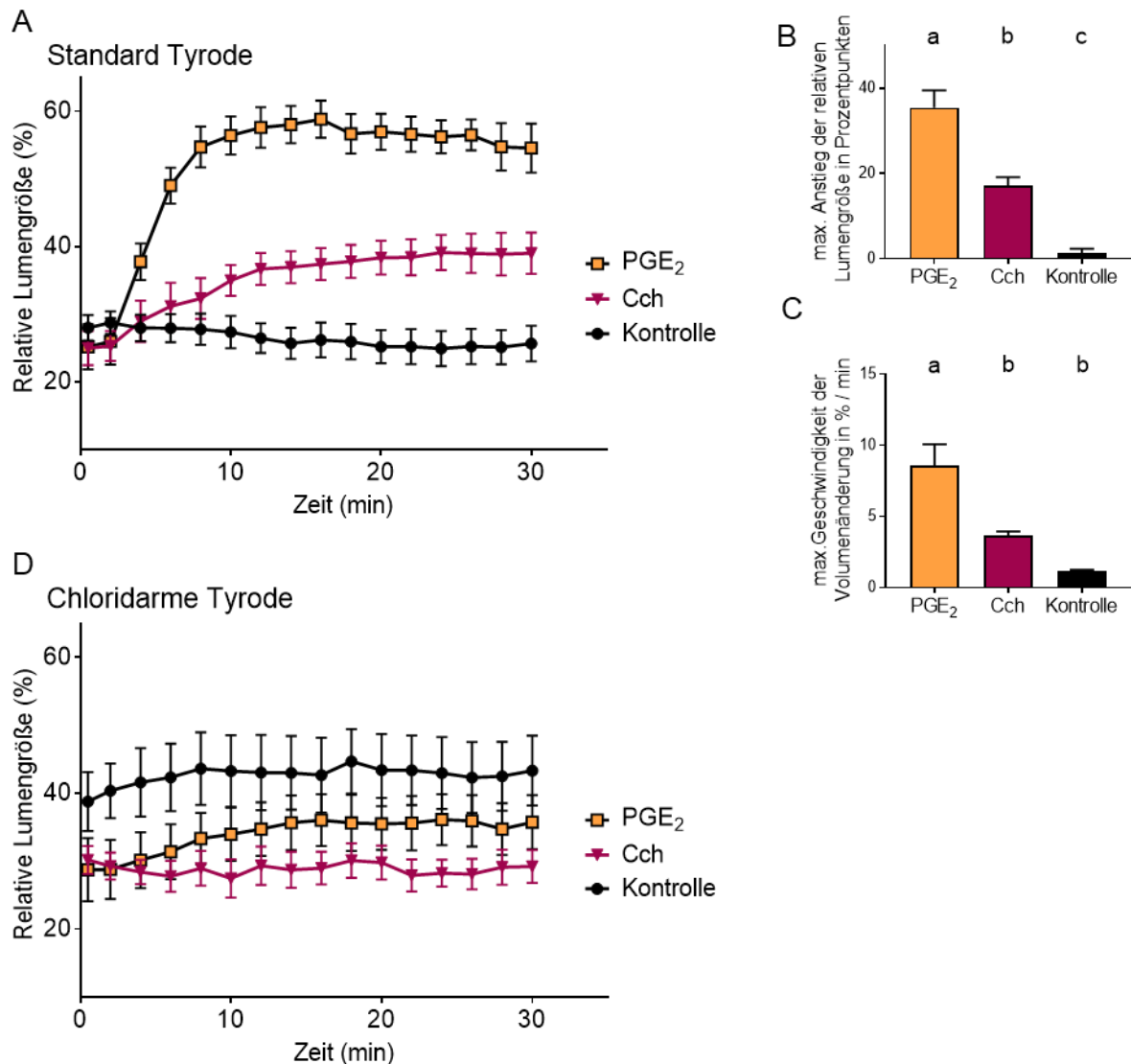


Abbildung 17: Schwellungsversuche

Änderung der relativen Lumengröße über eine Zeit von 30 min. Die Zugabe von PGE₂ (1 μM) und Carbachol (Cch; 50 μM) erfolgte 1 min nach Beginn der Messung. **A** zeigt den Verlauf in Standard Tyrode mit n = 10 - 11 Organoiden pro Gruppe. Der maximale Anstieg der relativen Lumengröße (**B**) und die maximale Geschwindigkeit der Volumenänderung (**C**) der Messungen in Standard Tyrode werden separat gezeigt. **D** zeigt den Verlauf in chloridarmer Tyrode mit n = 6 - 7 Organoiden pro Gruppe. Daten werden gezeigt als Mittelwert ± bzw. + SEM. Statistisch homogene Gruppen sind mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet (ANOVA gefolgt von Tukey's Post-hoc-Test).

Da die Morphologie der Organotide sowohl in den histologischen Färbungen als auch in den Immunfluoreszenzfärbungen der Erwartung entsprach und die Schwellungsversuche die Funktionalität in Bezug auf die Sekretion bestätigen konnten, wurden im Folgenden Zytokine eingesetzt, um eine Entzündung des Epithels zu simulieren. Es wurden die Effekte der proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor α , Interleukin 1β und Interferon γ untersucht, da diese eine zentrale Rolle in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielen (Pérez-Navarro et al. 2005; Singh et al. 2016; Nakase et al. 2022). Sowohl die verwendete Konzentration von $\text{TNF}\alpha$ (100 ng/ml) als auch diejenige von IL- 1β (20 ng/ml) wurde entsprechend der Literatur (Barmeyer et al. 2004) und vorangegangenen Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe (Ballout und Diener 2019) gewählt. Die Konzentration von $\text{IFN}\gamma$ (verwendet z.B. von (Barmeyer et al. 2004)) hingegen musste von 100 ng/ml auf 100 pg/ml reduziert werden, da die Organotide nach 5 d Inkubation mit der hohen Konzentration nicht mehr vital waren (siehe 6.4.1).

6.2 Tumornekrosefaktor α

Zunächst wurden die Organotide mit dem proinflammatorischen Zytokin Tumornekrosefaktor α ($\text{TNF}\alpha$), welches sowohl in der Pathogenese als auch als Ziel der Therapie von IBD eine wichtige Rolle spielt, inkubiert.

6.2.1 Morphologie

Eine Inkubation der Organotide mit 100 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ führte schon nach einem Tag zu massiven morphologischen Veränderungen. Die normalerweise deutlich ausgeprägten Villus- und Krypten-Domänen, zu erkennen an dem Vorhandensein von deutlichen Ausstülpungen und Einziehungen, waren kaum noch erkennbar. Die Organotide nahmen eine kugelige Form an, das Epithel flachte ab und es war vermehrt abgestorbenes

Zellmaterial im Lumen zu sehen (Abbildung 18). Dieses „Anschwellen“ der Organoide war mit längerer Inkubationszeit noch deutlicher sichtbar.

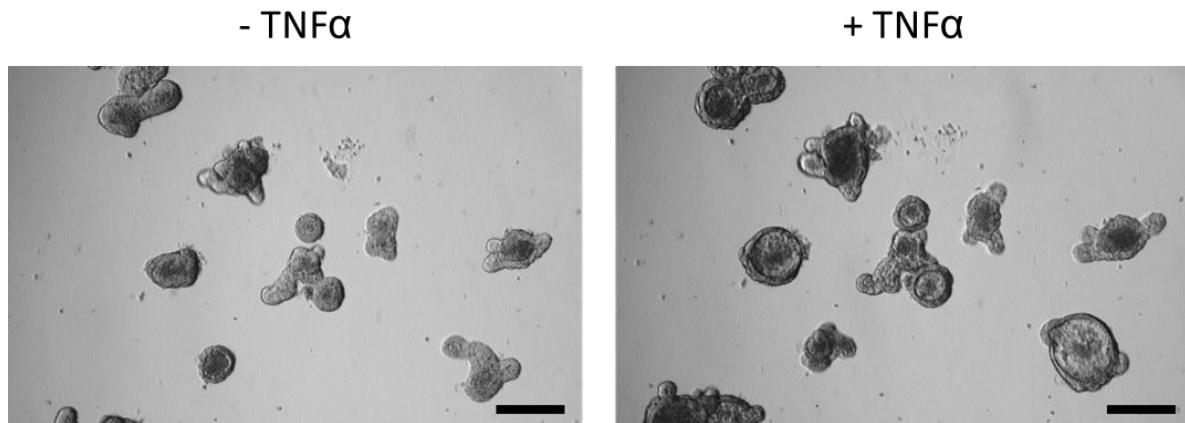


Abbildung 18: Organoide vor und 24 h nach TNF α

Durchlichtaufnahmen von Organoiden vor (links) und 24 h nach Inkubation mit TNF α (100 ng/ml) (rechts). Der Maßstab entspricht 200 μ m.

Die Schwellung der Organoide könnte folgende Ursache haben:

1. Die Apoptoserate steigt, die dadurch erhöhte Menge an Zellmaterial im Lumen dehnt das Organoid passiv und sorgt so für die Formveränderung.
2. Die Epithelbarriere wird durch TNF α geschädigt, wodurch das Epithel undicht wird und es durch den osmotischen Gradienten, aufgebaut durch das Zellmaterial im Lumen, zum passiven Einstrom von Wasser in das Organoidlumen kommt.
3. TNF α erhöht die aktive Sekretion von Elektrolyten und damit auch von Wasser in das Organoidlumen.

Diese 3 Hypothesen wurden im Folgenden getestet.

6.2.2 Apoptoserate

Die Behandlung der Organoide mit 100 ng/ml TNF α für einen Tag erhöhte die Menge an abgestorbenem Zellmaterial im Lumen der einzelnen Organoide (Abbildung 18). Um herauszufinden, ob dies an einer erhöhten Apoptoserate lag, wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Hierbei wurde ein Antikörper gegen die aktivierte Caspase 3 verwendet. Die aktivierte Caspase 3 stellt ein wichtiges Schlüsselenzym in der Reaktionskaskade der Apoptose dar, da dieses sowohl über den intrinsischen als auch über den extrinsischen Weg der Apoptoseinduktion aktiviert wird (Lossi 2022). Die Zellen, welche für Caspase 3 und die Zellkernfärbung DAPI positiv waren, wurden verblindet gezählt (Abbildung 19). Bei den Kontrollorganoiden waren $5,2 \pm 1,8$ Zellen pro Aufnahme positiv für beide Signale. Dies war mehr als verdoppelt nach der Inkubation mit TNF α (Abbildung 19).

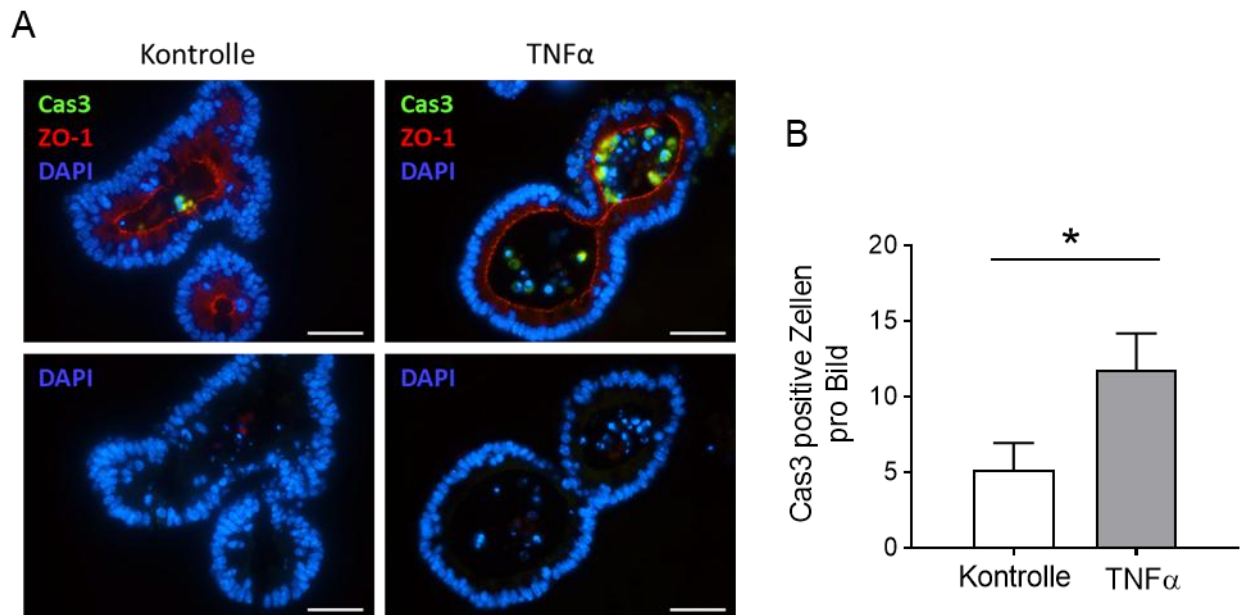


Abbildung 19: Caspase-3 positive Zellen

A Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von Caspase 3-positiven Zellen (Cas3; in Kombination mit Alexa488 rabbit IgG). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und Zonula Occludens-1 (ZO-1; in Kombination mit Cy3 rat IgG) wurde genutzt, um das Lumen der Organoide abzugrenzen. Die Negativfärbung ohne die Primärantikörper (letzte Reihe) wurde parallel durchgeführt. In der linken Spalte sind unbehandelte Organoide (Kontrolle), in der rechten Organoide, die mit TNF α (100 ng/ml, 1 d) vorinkubiert wurden, zu sehen (TNF α). Maßstab = 40 μ m. **B** Zellen, die sowohl für das Cas3-Signal als auch für das DAPI-Signal positiv waren, wurden verblindet gezählt. Analysiert wurden 14 (Kontrolle) bzw. 16 (TNF α) Bilder (abgedeckte Fläche pro Bild: 256 μ m x 198 μ m) von 3 unterschiedlichen Passagen (22 Kontrollorganoide und 25 TNF α behandelte Organoide). Die Daten werden gezeigt als Mittelwert + SEM (* $p < 0,05$ vs. Kontrollorganoide ohne Zytokinvorbehandlung).

6.2.3 Schwellung durch TNF α

Neben der vermehrten Füllung mit apoptotischen Zellen kam es durch TNF α auch zu einer Vergrößerung des Lumens. Um dies zu quantifizieren, wurden 24 h-Zeitrafferaufnahmen durchgeführt. Verwendet wurden Organoide, die mit 100 ng/ml TNF α inkubiert wurden, sowie parallel dazu zeitabhängige Kontrollen ohne Zytokinexposition. Nach Bestimmung der relativen Lumengröße wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt, die einen konstanten, linearen Anstieg der relativen Lumengröße bei den mit TNF α inkubierten Organoiden zeigte. Die Steigung der mit TNF α behandelten Gruppe ($0,87 \pm 0,04$ %/h, n = 7) war dabei signifikant höher als bei der zeitabhängigen Kontrollgruppe ($0,07 \pm 0,04$ %/h, p < 0,05; n = 5; Abbildung 20).

Nach 22 h war die relative Lumengröße der mit TNF α inkubierten Organoide um $36,1 \pm 2,0$ Prozentpunkte angestiegen. Die halbmaximale Schwellung wurde dabei nach ca. $10,1 \pm 1,8$ h erreicht. Die relative Lumengröße der unbehandelten Organoide blieb hingegen über 22 h konstant. Der Anstieg der relativen Lumengröße in Reaktion auf die Vitalitätskontrolle mit Forskolin (9 μ M) nach 22 h fiel in beiden Gruppen gleich stark aus (Kontrolle: $33,4 \pm 1,8$; TNF α : $28,6 \pm 2,9$ Prozentpunkte).

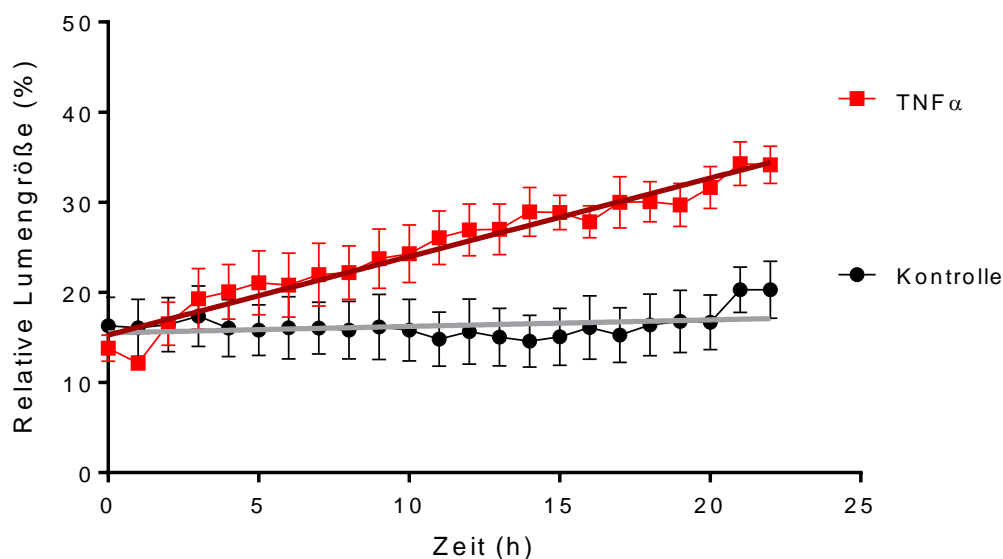


Abbildung 20: TNF α -induzierte Schwellung über 22 h

Die Änderung der relativen Lumengröße (Größe des Lumens/Größe des gesamten Organoids * 100 %) über eine Zeit von 22 h bei unbehandelten Organoiden (schwarz) und Organoiden, die ab dem Beginn des Experiments mit TNF α (100 ng/ml) inkubiert wurden (rot). Die stündlich ausgewerteten Daten sind gezeigt als relative Lumengröße in % \pm SEM von $n = 5 - 7$ Organoiden pro Gruppe aus je 3 unterschiedlichen Passagen. Die Kurven wurden über eine lineare Regressionsanalyse gefittet (GraphPad Prism (5.01)).

6.2.4 Veränderte Genexpression nach TNF α

Eine mögliche Hypothese für das Anschwellen der Organoiden ist eine defekte Epithelbarriere. Um die Langzeiteffekte von TNF α auf die Expression von essentiellen Komponenten der Epithelbarriere zu untersuchen, wurden qPCR Experimente durchgeführt. Die Barriereproteine Zonula Occludens-1, Claudin 2 und 3 wurden nach 5 d TNF α -Inkubation untersucht und mit unbehandelten Organoiden, aus jeweils 3 unterschiedlichen Passagen, verglichen. Es konnte bei keinem dieser Gene eine Herauf- oder Herunterregulierung festgestellt werden (Abbildung 21). Ein Anstieg der Expression des NF- κ B Inhibitors alpha (I κ B α) wurde als Indikator für einen TNF α -

Effekt an den Organoiden genutzt (Bottero et al. 2003; Ait-Ali et al. 2008), erreichte aber aufgrund einer zu hohen Streuung keine Signifikanz. Neben den Barriereproteinen wurde auch Mucin 2 (Muc2), ein Becherzellmarker (Kang et al. 2022), untersucht, dessen Expression nach 5 d TNF α verglichen mit den Kontrollorganoiden signifikant reduziert war. Im Hinblick auf die Hypothese der erhöhten Sekretion durch TNF α wurde auch die Expression der bei der Chloridsekretion wichtigen Transporter NKCC1 und CFTR untersucht. Hierbei war NKCC1 nach TNF α -Inkubation signifikant hochreguliert, wohingegen die Expression des CFTR-Kanals unverändert blieb (Abbildung 21).

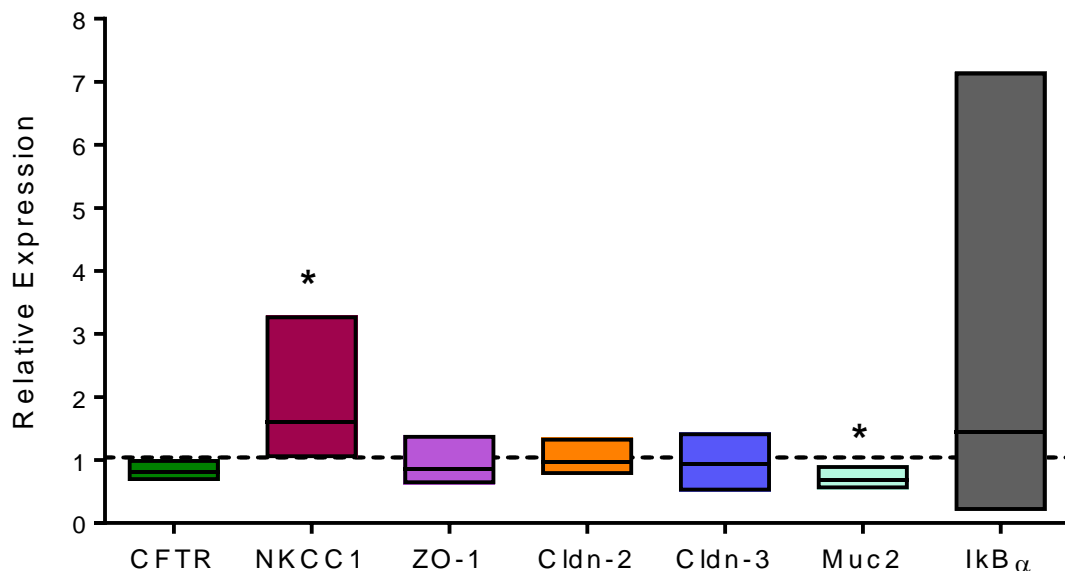


Abbildung 21: qPCR TNF α

*Relative Expression der mit TNF α (100 ng/ml, 5 d) inkubierten Organoide verglichen mit Kontrollorganoiden (gestrichelte Linie bei 1). Als Referenzgene für die Normalisierung dienten Gapdh und Gusb. Die Daten werden gezeigt als arithmetisches Mittel (schwarze Linie) \pm 95 % Konfidenzintervall (Rechteck), n = 3 unterschiedliche Passagen. * p < 0,05 vs. Kontrollorganoide ohne Zytokinvorbehandlung (analysiert mit REST2009).*

6.2.5 Immunfluoreszenz von NKCC1

Um die erhöhte Genexpression von NKCC1 auf Proteinlevel qualitativ zu bestätigen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen sowohl von unbehandelten als auch von mit TNF α inkubierten Organoiden (100 ng/ml, 1 d und 5 d) angefertigt. Das Fluoreszenzsignal dieses Chloridtransporters wurde an der basolateralen Membran der Organoide detektiert (Abbildung 22). Dies entspricht der physiologischen Lokalisation des NKCC1 im Darmepithel (Negussie et al. 2022). Jedoch konnte weder ein offensichtlich verstärktes Signal noch eine Veränderung der Lokalisation der Immunreaktivität bei den mit TNF α behandelten Organoiden festgestellt werden.

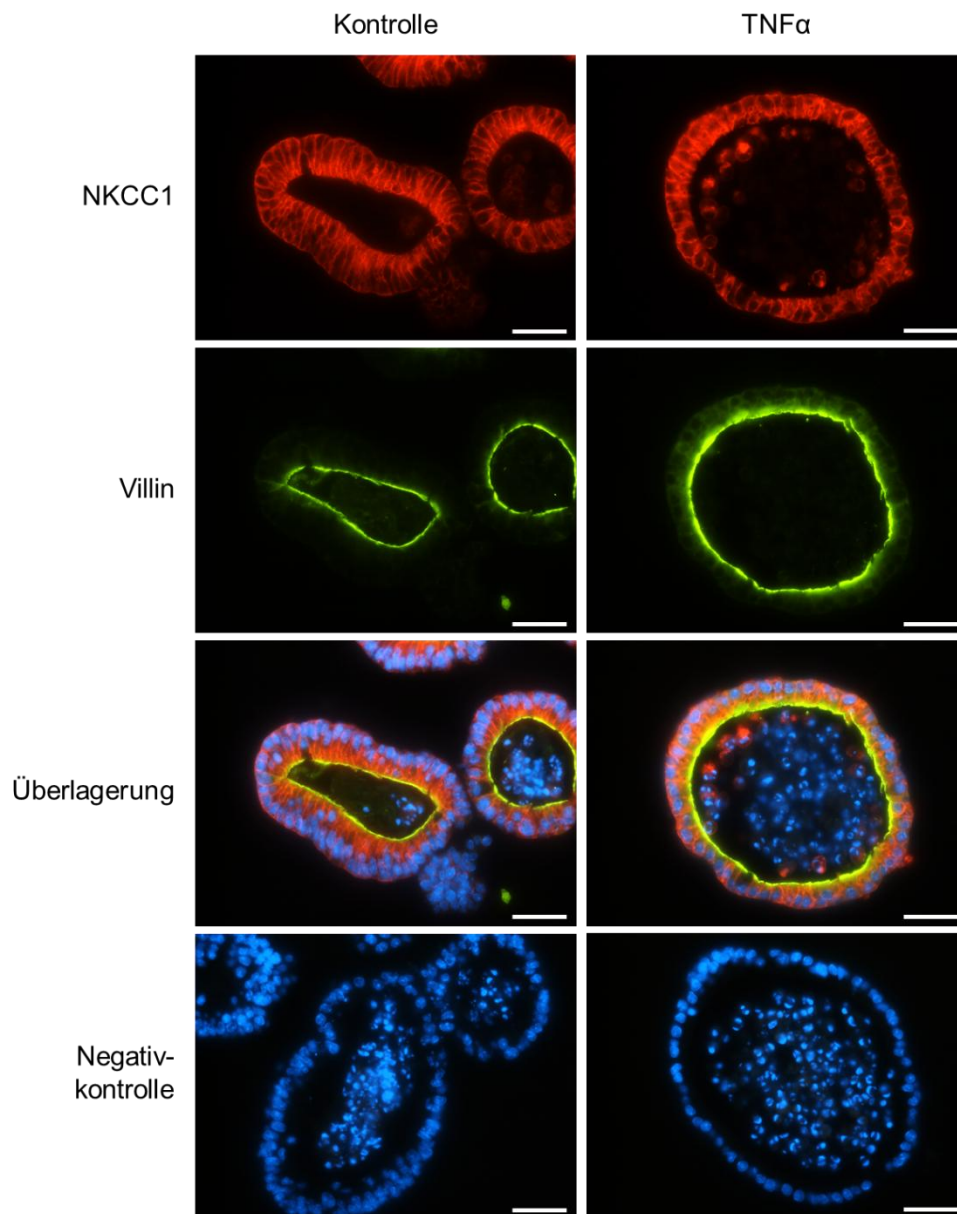


Abbildung 22: Immunfluoreszenz NKCC1

Repräsentative Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen mit NKCC1 (in Kombination mit Cy3 anti rabbit IgG) und Villin (in Kombination mit Alexa488 anti mouse IgG; Tabelle 1) von unbehandelten Organoiden (linke Spalte) und mit TNF α (100 ng/ml, 1 d) behandelten Organoiden (rechte Spalte). Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Die Negativfärbung ohne die Primärantikörper (letzte Reihe) wurde parallel durchgeführt. Der Maßstab beträgt 25 μ m. Es wurden Färbungen von Organoiden aus n = 3 Passagen angefertigt.

6.2.6 Bumetanid reduziert die TNF α -induzierte Schwellung

Um festzustellen, ob der NKCC1 eine Rolle in der TNF α -induzierten Schwellung spielt, wurde der Anstieg der relativen Lumengröße durch TNF α -Inkubation (100 ng/ml, 1 d) mittels ImageJ ausgewertet. Es kam durch TNF α nach 24 h zu einem Anstieg der relativen Lumengröße um $19,4 \pm 2,1$ Prozentpunkte. Bei Organoiden, die zusätzlich zu TNF α auch noch mit Bumetanid, einem Blocker von Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransportern (Zhao et al. 2022), inkubiert wurden, war der Anstieg der relativen Lumengröße um mehr als die Hälfte reduziert ($8,8 \pm 1,7$ Prozentpunkte; Abbildung 23). Am humanen Kolon wurde gezeigt, dass TNF α vermittelt über PGE₂ eine cAMP-abhängige Sekretion induziert (Schmitz et al. 1996). Daher wurde getestet, ob Indometacin, ein Blocker der Cyclooxygenase (COX; Ninnemann 1984) und somit der PGE₂-Synthese, die durch TNF α ausgelöste Schwellungsantwort beeinflusst. Die zusätzliche Inkubation mit Indometacin hatte jedoch fast keinen Effekt auf die Stärke der Schwellung ($15,6 \pm 1,6$ Prozentpunkte; Abbildung 23). Ethanol wurde als Lösungsmittel für die verwendeten Substanzen genutzt und hatte in den Versuchen eine maximalen Endkonzentration von 0,5 % (v/v). In dieser Konzentration hatte Ethanol keinen Effekt auf die Schwellung der Organoide ($17,0 \pm 2,1$ Prozentpunkte; Abbildung 23).

Ergebnisse

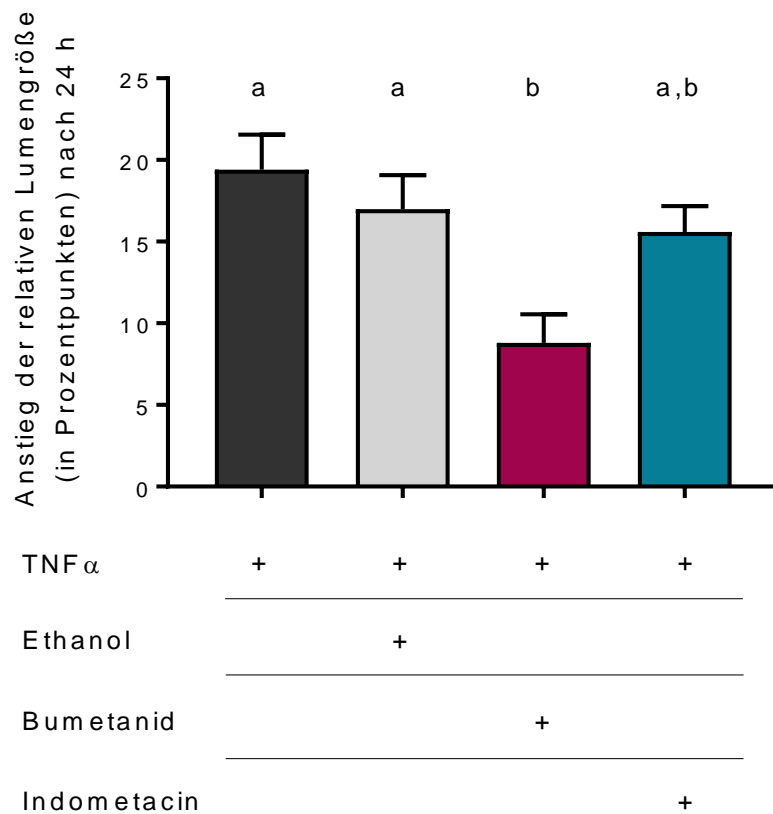


Abbildung 23: Bumetanid reduziert die TNF α -induzierte Schwellung

Anstieg der relativen Lumengröße (in Prozentpunkten) nach eintägiger Inkubation mit TNF α (100 ng/ml) verglichen mit Organoiden, die mit TNF α + Bumetanid (100 μ M) und Organoiden die mit TNF α + Indometacin (100 μ M) behandelt wurden. Ethanol (0,5 % (v/v)) diente als Lösungsmittelkontrolle. Die Daten werden dargestellt als Differenz der relativen Lumengröße zwischen Anfang und Ende des Experiments (24 h) und zeigen den Mittelwert + SEM. Es wurden $n = 30$ Organoide aus 3 unterschiedlichen Passagen pro Gruppe untersucht. Statistisch homogene Gruppen sind mit dem gleichen Buchstaben markiert ($p < 0,05$; ANOVA gefolgt von einem Tukey's Post-hoc-Test).

6.2.7 Ca²⁺-Imaging

Da die Experimente mit Indometacin (Abbildung 23) keinen Hinweis auf eine Beteiligung von Prostaglandinen (die cAMP-vermittelt eine Sekretion auslösen) an der Schwellungsantwort ergaben, wurden Ca²⁺-Imaging Experimente durchgeführt, um herauszufinden, ob TNF α die Ca²⁺-medierte Cl-Sekretion beeinflusst. Hierzu wurden die Organoide mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 aufgeladen und mit dem Acetylcholinderivat Carbachol (50 μ M) stimuliert. Es wurden Kontrollorganoide mit Organoiden verglichen, die für 1 d, 3 d, oder 5 d mit TNF α (100 ng/ml) inkubiert worden waren. Hierbei wurden schon bei den basalen Fura-2-Signalen zeitabhängige Veränderungen nach Exposition mit dem Zytokin beobachtet. Nach 1 d TNF α -Inkubation war die basale Fura-2 Ratio signifikant höher ($3,55 \pm 0,06$) verglichen mit den unbehandelten Organoiden ($3,07 \pm 0,07$; $p < 0,05$). Nach 3 d TNF α war dieser Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der TNF α -Gruppe verschwunden (Tabelle 3). Bei noch längerer Inkubation (5 d) sank das basale Fura-2 Ratio-Signal dann sogar unter das Niveau der unbehandelten Gruppe (Unterschied ca. 15 %, $p < 0,05$; Tabelle 3).

Die Zugabe von Carbachol löste in allen Gruppen einen transienten Anstieg des Fura-2 Ratio-Signals aus (siehe Abbildung 24 A, B). Wenn die Organoide in Ca²⁺-haltigem Puffer gemessen wurden, war solch ein Anstieg in > 98 % der Organoide messbar (Tabelle 3). Nur nach dreitägiger Inkubation mit TNF α kam es zu einer signifikant erhöhten Antwort auf die Stimulation mit Carbachol ($1,65 \pm 0,07$) im Vergleich zu unbehandelten Organoiden ($1,17 \pm 0,14$; $p < 0,05$). In allen anderen Fällen bestand kein signifikanter Unterschied in der Carbacholantwort zwischen den mit TNF α behandelten und den Kontrollorganoiden (Tabelle 3).

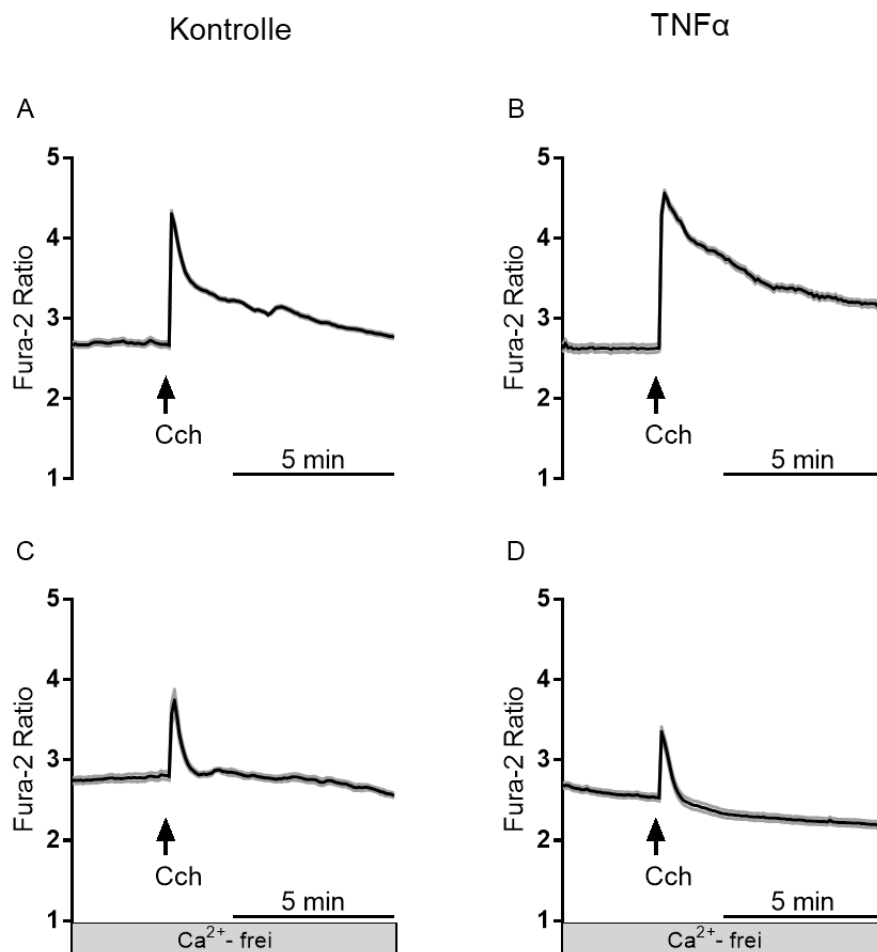


Abbildung 24: Repräsentative Kurven von Ca^{2+} -Imaging-Experimenten

Der Effekt von Carbachol (Cch; $50 \mu M$) in Standard Tyrode (A, B) und in calciumfreier Tyrode (C, D) auf unbehandelte Organoide (linke Spalte, A, C) und mit TNF α (100 ng/ml , 3 d) inkubierte Organoide (rechte Spalte, B, D). Die Daten sind Mittelwert (schwarze Linie) \pm SEM (graue Linien), $n = 6 - 15$ Zellen in je einem Organoid.

6.2.7.1 Abhängigkeit des TNF α -Effektes von extrazellulärem Ca^{2+}

Um herauszufinden, ob TNF α den Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum oder die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern beeinflusst, wurden Versuche in calciumfreier Tyrode durchgeführt. Hier war das basale Fura-2 Ratio-Signal nach TNF α -Inkubation für 1 d um 7 % und nach 5 d um ca. 40 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen signifikant reduziert ($p < 0,05$, vgl. Tabelle 3). In der

Reaktion auf die Stimulation mit Carbachol wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Organoiden mit und ohne TNF α -Inkubation festgestellt, wenn Ca²⁺ im Extrazellulärraum fehlte. Die Amplitude des durch Carbachol ausgelösten Anstiegs des Fura-2-Signals war sowohl bei den mit TNF α behandelten als auch bei den unbehandelten Organoiden deutlich kleiner im Vergleich zu den entsprechenden Antworten bei Messung in calciumhaltiger Standard Tyrode (Tabelle 3, Abbildung 24 C, D). Dies deutet darauf hin, dass es zu einer Verminderung des Ca²⁺-Gehalts der intrazellulären Speicher kommt, wenn extrazellulär kein Ca²⁺ zur Wiederauffüllung der Speicher zur Verfügung steht.

Tabelle 3: Ca²⁺-Imaging TNF α

			Basales Fura-2 Ratio- Signal	Carbachol induzierter Peak (Δ Fura-2 Ratio)	Zellen, die auf Carbachol reagierten		
					%	n	
Standard Tyrode (Ca ²⁺ -haltig)	1 d	+ TNF α	3,55 \pm 0,06* \uparrow	1,10 \pm 0,05	100	50/50	
		- TNF α	3,09 \pm 0,07	1,01 \pm 0,05	100	50/50	
	3 d	+ TNF α	3,08 \pm 0,06	1,65 \pm 0,07* \uparrow	98	60/61	
		- TNF α	2,98 \pm 0,09	1,17 \pm 0,14	100	55/55	
	5 d	+ TNF α	2,71 \pm 0,16* \downarrow	1,93 \pm 0,16	100	51/51	
		- TNF α	3,22 \pm 0,07	1,92 \pm 0,13	100	50/50	
	Calcium- freie Tyrode	1 d	+ TNF α	3,07 \pm 0,07 ^{#*} \downarrow	0,65 \pm 0,05 [#]	96	55/57
			- TNF α	3,30 \pm 0,08 [#]	0,56 \pm 0,04 [#]	72	38/53
3 d		+ TNF α	2,89 \pm 0,12 [#]	0,92 \pm 0,06 [#]	85	52/61	
		- TNF α	2,75 \pm 0,08	0,81 \pm 0,08 [#]	100	53/53	
5 d		+ TNF α	2,04 \pm 0,05 ^{#*} \downarrow	1,24 \pm 0,09 [#]	93	53/57	
		- TNF α	3,44 \pm 0,13	1,46 \pm 0,11 [#]	85	40/47	

Die Wirkung von Carbachol ist als Anstieg des Fura-2-Signals gegenüber der Baseline direkt vor Zugabe des Agonisten (Δ Fura-2 Ratio) angegeben. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ (- TNF α vs. + 100 ng/ml TNF α); # $p < 0,05$ (Standard Tyrode vs. calciumfreie Tyrode). \downarrow \uparrow symbolisieren die Richtung der Änderung im Vergleich zu den Organoiden ohne Zytokinvorinkubation. n = Zellen aus Organoiden von 3 unterschiedlichen Passagen.

6.2.7.2 Lanthan unterdrückt die Stimulation der Carbacholantwort durch TNF α

Die Beobachtung, dass die Verstärkung der Carbacholantwort durch TNF α in Ca²⁺-freiem Puffer nicht mehr auftritt (Tabelle 3, Abbildung 24), legt die Vermutung nahe, dass der Effekt des Zytokins in einer Erhöhung des Ca²⁺-Einstroms aus dem Extrazellulärraum besteht. Um die Ursache des vermehrten Ca²⁺-Einstromes nach 3 d TNF α besser eingrenzen zu können, wurden für diesen Zeitpunkt Imaging-Versuche mit Lanthan (La³⁺) durchgeführt, einem Blocker nichtselektiver Kationenkanäle, die eine wichtige Rolle beim kapazitiven Ca²⁺-Einstrom im Darmepithel spielen (Frings et al. 1999). Diese Versuche wurden in calciumhaltiger Tyrode durchgeführt. Hierfür wurde nach einer stabilen Baseline von mind. 3 min La³⁺ (1 mM) zu den Organoiden gegeben, gefolgt von Carbachol (50 μ M; nach 10 - 15 min) und CPA (5 μ M; nach 10 - 15 min) als Vitalitätskontrolle.

Die Zugabe von La³⁺ führte paradoxerweise zu einem transienten Anstieg der Fura-2 Ratio (siehe Diskussion). Wurde danach Carbachol appliziert, war die Stimulation der Carbacholantwort durch TNF α komplett unterdrückt. In Gegenwart von La³⁺ fiel die Carbacholantwort mit einem Anstieg des Fura-2-Signals von $0,36 \pm 0,03$ nach Zytokinvorbehandlung sogar niedriger aus als in der entsprechenden Kontrollgruppe, die nur mit La³⁺ (aber ohne Zytokinvorbehandlung) behandelt worden war. In diesen Organoiden induzierte Carbachol einen Anstieg des Fura-2-Signals von $0,46 \pm 0,03$ (Abbildung 25). Auch der Anteil der Organoide, die nach La³⁺-Zugabe noch auf Carbachol reagierten, war deutlich geringer (45,2 - 61,5 %; Tabelle 4). Diese Befunde sprechen dafür, dass TNF α den Einstrom vom Ca²⁺ aus dem Extrazellulärraum beeinflusst.

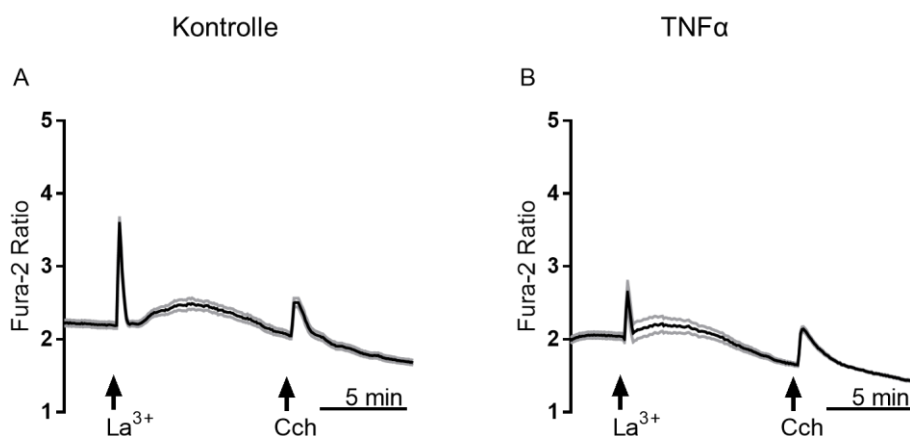


Abbildung 25: Ca-Imaging-Experimente mit Lanthan

Repräsentative Kurven der Effekte von Lanthan (La^{3+} ; 1 mM) und Carbachol (Cch; 50 μM) auf unbehandelte Organoide (A) und mit $TNF\alpha$ (100 ng/ml, 3 d) inkubierte Organoide (B) in Standard Tyrode. Die Daten sind Mittelwert (schwarze Linie) \pm SEM (graue Linien), $n = 12 - 17$ Zellen in je einem Organoid.

Tabelle 4: Ca^{2+} -Imaging mit La^{3+} -Vorbehandlung ($TNF\alpha$)

		Carbachol-induzierter Peak ($\Delta Fura-2$ Ratio)	Zellen, die auf Carbachol reagieren	
			%	n
Standard Tyrode (Ca^{2+} -haltig)	+ $TNF\alpha$	$0,36 \pm 0,03^*$ ↓	45	28/62
	- $TNF\alpha$	$0,46 \pm 0,03$	62	32/52

Die Wirkung von Carbachol ist als Anstieg des Fura-2-Signals gegenüber der Baseline direkt vor Zugabe des Agonisten ($\Delta Fura-2$ Ratio) angegeben. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. $\downarrow\uparrow$ symbolisieren die Richtung der Änderung im Vergleich zu den Organoiden ohne Zytokinvorinkubation. * $p < 0,05$ vs. Organoide mit $TNF\alpha$ -Inkubation (100 ng/ml, 3 d). $n =$ Zellen aus Organoiden von 3 unterschiedlichen Passagen.

6.3 Interleukin 1 β

Interleukin 1 β (IL-1 β) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das hauptsächlich von Makrophagen produziert wird (Lopez-Castejon und Brough 2011). Es ist u.a. beteiligt an der Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen. Eine Imbalance von IL-1 β und seinem Gegenspieler, dem IL-1R Antagonist, spielt möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese von IBD (Neurath 2014).

6.3.1 Morphologie

Durch die Inkubation mit Interleukin 1 β (20 ng/ml) waren weder nach 1 d noch nach 3 d oder 5 d morphologische Veränderungen an den Organoiden erkennbar (Daten nicht gezeigt). Auch wenn kein Anschwellen der Organoiden wie nach TNF α -Inkubation beobachtet werden konnte, sollte dennoch abgeklärt werden, ob möglicherweise das intrazelluläre Ca²⁺-Signaling der Epithelzellen durch IL-1 β beeinflusst wurde.

6.3.2 Ca²⁺-Imaging

An Organoiden, die für 1 d, 3 d oder 5 d mit IL-1 β (20 ng/ml) inkubiert worden waren, wurden Ca²⁺-Imaging Versuche in Standard Tyrode und calciumfreier Tyrode durchgeführt. In der Standard Tyrode war nach 5 d Inkubation mit IL-1 β das basale Fura-2 Ratio-Signal signifikant niedriger ($2,93 \pm 0,08$) als in der Kontrollgruppe ($3,50 \pm 0,08$). Der durch Carbachol (50 μ M) induzierte Peak war nach 3 d IL-1 β -Inkubation signifikant kleiner (um ca. 25 %) verglichen mit unbehandelten Organoiden. Dies war weder nach einem noch nach 5 d der Fall (Tabelle 5).

In calciumfreier Tyrode sah dies anders aus. Hier war der Carbachol-Peak nach 1 d IL-1 β -Inkubation signifikant reduziert (um etwa 40 %) im Vergleich zu den unbehandelten Organoiden, nach 5 d IL-1 β hingegen signifikant erhöht (um ca. 40 %) (vgl. Tabelle 5). Nach 3 d Inkubation konnte in calciumfreier Tyrode kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Insgesamt waren auch bei IL-1 β – erwartungsgemäß – die Carbachol-Peaks in den jeweiligen Versuchsgruppen kleiner,

wenn die Versuche in calciumfreier Tyrode durchgeführt wurden (Tabelle 5). Allerdings waren auch in calciumfreier Tyrode Unterschiede in der Carbacholantwort nach Vorbehandlung mit diesem Zytokin zu messen, was dafür spricht, dass IL-1 β im Unterschied zu TNF α nicht nur den Einstrom vom Ca²⁺ aus dem Extrazellulärraum beeinflusst, sondern möglicherweise auch die Freisetzung aus intrazellulären Speichern.

Tabelle 5: Ca²⁺-Imaging IL-1 β

			Basales Fura-2 Ratio- Signal	Carbachol induzierter Peak (Δ Fura-2 Ratio)	Zellen, die auf Carbachol reagieren	
					%	n
Standard Tyrode (Ca ²⁺ -haltig)	1 d	+ IL-1 β	3,41 \pm 0,09	0,93 \pm 0,04	89	48/54
		- IL-1 β	3,42 \pm 0,09	0,88 \pm 0,05	100	58/58
	3 d	+ IL-1 β	3,35 \pm 0,06	1,31 \pm 0,08* ↓	93	43/46
		- IL-1 β	3,32 \pm 0,08	1,74 \pm 0,08	100	41/41
	5 d	+ IL-1 β	2,93 \pm 0,08* ↓	1,40 \pm 0,10	100	54/54
		- IL-1 β	3,50 \pm 0,08	1,25 \pm 0,08	100	49/49
Calcium- freie Tyrode	1 d	+ IL-1 β	3,41 \pm 0,10	0,40 \pm 0,03 ^{#*} ↓	84	32/38
		- IL-1 β	3,34 \pm 0,08	0,7 \pm 0,05 [#]	87	53/61
	3 d	+ IL-1 β	3,24 \pm 0,10	0,92 \pm 0,07 [#]	90	37/41
		- IL-1 β	3,25 \pm 0,12	0,91 \pm 0,06 [#]	100	42/42
	5 d	+ IL-1 β	3,04 \pm 0,09	0,78 \pm 0,06 ^{#*} ↑	100	49/49
		- IL-1 β	2,96 \pm 0,12 [#]	0,56 \pm 0,05 [#]	90	54/60

Die Wirkung von Carbachol ist als Anstieg des Fura-2-Signals gegenüber der Baseline direkt vor Zugabe des Agonisten (Δ Fura-2 Ratio) angegeben. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ (- IL-1 β vs. + 20 ng/ml IL-1 β); # $p < 0,05$ (Standard Tyrode vs. calciumfreie Tyrode). ↓↑ symbolisieren die Richtung der Änderung im Vergleich zu den Organoiden ohne Zytokinvorinkubation. n = Zellen aus Organoiden von 3 unterschiedlichen Passagen.

6.4 Interferon γ

In Serumproben von IBD Patienten wurden auch erhöhte Konzentrationen von Interferon γ (IFN γ) festgestellt (Singh et al. 2016). Das proinflammatorische Zytokin wird u.a. von mukosalen T-Zellen gebildet und spielt sowohl bei der Induktion der Apoptose von Epithelzellen als auch bei der Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen sowie vielen anderen Immunzellen eine Rolle (Schroder et al. 2004; Neurath 2024). Daher wurde getestet, welchen Effekt dieses Zytokin auf die murinen Dünndarmorganoide in vitro ausübt.

6.4.1 Morphologie

Die Inkubation der Organoide mit IFN γ führte bei der in den nachfolgenden Versuchen verwendeten Konzentration von 100 pg/ml zu keinen morphologischen Veränderungen. Bei höheren Konzentrationen von bis zu 100 ng/ml fand sich vermehrt abgestorbenes Zellmaterial im Lumen und das Epithel war massiv aufgequollen. Nach 5 d 100 ng/ml IFN γ waren die Organoide zu toten Zellhaufen zerfallen (Abbildung 26).

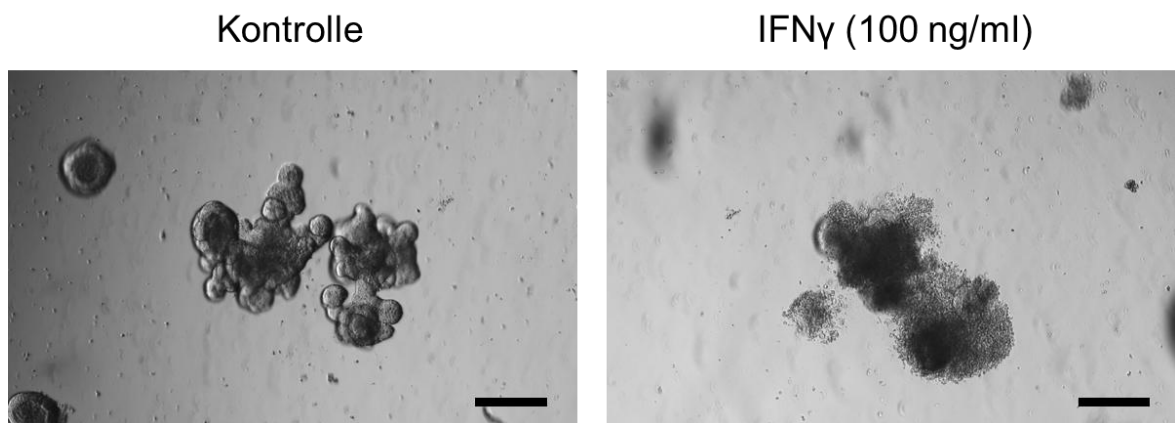


Abbildung 26: Hochdosiert IFN γ

Organoide 5 d nach Passagieren unbehandelt (links) und mit der hohen Konzentration an IFN γ (100 ng/ml) inkubiert (rechts). Der Maßstab entspricht 100 μ m.

6.4.2 Ca²⁺-Imaging

Da eine Konzentration von 100 ng/ml offenkundig toxisch auf die Organoide wirkt (Abbildung 26), wurde für die Ca²⁺-Imaging-Versuche die Konzentration von IFN γ um 3 Zehnerpotenzen reduziert. Die Effekte von IFN γ (100 pg/ml) auf das Ca²⁺-Signaling in Dünndarmorganoiden scheinen sehr zeitabhängig zu sein. Während die basale Fura-2 Ratio nach 5 d Inkubation mit IFN γ in Standard Tyrode signifikant vermindert war (um knapp 10 %; Tabelle 6), war die basale Fura-2 Ratio in calciumfreier Tyrode nach 3- und 5-tägiger Inkubation der Organoide mit dem Zytokin signifikant um etwa 10 % erhöht gegenüber den unbehandelten Organoiden (Tabelle 6).

Eine starke Zeitabhängigkeit war auch in der Beeinflussung der Reaktion auf Carbachol (50 μ M) durch dieses Zytokin zu sehen. Hier war der Peak in Ca²⁺-haltiger Standard Tyrode nach 3 d Inkubation mit IFN γ signifikant reduziert ($1,36 \pm 0,14$ vs. $1,8 \pm 0,07$) und nach 5 d Inkubation mit IFN γ hingegen signifikant vergrößert ($1,88 \pm 0,06$) verglichen mit der Kontrollgruppe ($1,58 \pm 0,09$; Tabelle 6). Dieser Effekt war in calciumfreier Tyrode nicht zu beobachten, was dafür spricht, dass IFN γ genau wie TNF α (Tabelle 3) den Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ in den Epithelzellen moduliert.

Tabelle 6: Ca²⁺-Imaging IFN γ

			Basales Fura-2 Ratio- Signal	Carbachol induzierter Peak (Δ Fura-2 Ratio)	Zellen, die auf Carbachol reagierten	
					%	n
Standard Tyrode (Ca ²⁺ -haltig)	1 d	+ IFN γ	3,20 \pm 0,08	1,65 \pm 0,06	100	53/53
		- IFN γ	3,12 \pm 0,05	1,52 \pm 0,08	100	58/58
	3 d	+ IFN γ	2,98 \pm 0,11	1,36 \pm 0,14* ↓	100	74/74
		- IFN γ	3,38 \pm 0,07	1,81 \pm 0,07	100	62/62
	5 d	+ IFN γ	2,68 \pm 0,04* ↓	1,88 \pm 0,06* ↑	100	52/52
		- IFN γ	2,87 \pm 0,05	1,58 \pm 0,09	100	60/60
Calcium- freie Tyrode	1 d	+ IFN γ	2,47 \pm 0,02 [#]	0,88 \pm 0,08 [#]	85	56/66
		- IFN γ	2,39 \pm 0,06 [#]	0,95 \pm 0,07 [#]	98	53/54
	3 d	+ IFN γ	2,79 \pm 0,07 ^{#*} ↑	1,25 \pm 0,09	89	59/66
		- IFN γ	2,55 \pm 0,04 [#]	1,31 \pm 0,11 [#]	92	60/65
	5 d	+ IFN γ	2,49 \pm 0,06* ↑	0,78 \pm 0,07 [#]	100	56/56
		- IFN γ	2,20 \pm 0,055 [#]	0,88 \pm 0,08 [#]	96	48/50

Die Wirkung von Carbachol ist als Anstieg des Fura-2-Signals gegenüber der Baseline direkt vor Zugabe des Agonisten (Δ Fura-2 Ratio) angegeben. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ (– IFN γ vs. + 100 pg/ml IFN γ); # $p < 0,05$ (Standard Tyrode vs. calciumfreie Tyrode). ↓↑ symbolisieren die Richtung der Änderung im Vergleich zu den Organoiden ohne Zytokinvorinkubation. n = Zellen aus Organoiden von 3 unterschiedlichen Passagen.

6.5 Zytokin-Mix

Da in vivo nie nur ein Zytokin auf das Gewebe wirkt, ist es für ein realistisches In-vitro-Entzündungsmodell wichtig, die proinflammatorischen Botenstoffe auch in Kombination zu testen. Die Effekte der einzelnen Zytokine können sich deutlich verändern, wenn sie gemeinsam auf Gewebe wirken. Sie können sich sowohl synergistisch verstärken (Bode et al. 1998) als auch im Fall antiinflammatorischer Zytokine (Topper et al. 1997; Payvandi et al. 2004) gegenseitig aufheben.

6.5.1 Morphologie

Durch die gleichzeitige Inkubation mit den drei Zytokinen TNF α (100 ng/ml), IL-1 β (20 ng/ml) und IFN γ (100 pg/ml) änderte sich die Form der Organoide massiv. Sie ähnelten stark den Organoiden, die nur mit TNF α inkubiert wurden (vgl. Abbildung 18 und Abbildung 27), d.h. sie zeigten eine starke Schwellung verbunden mit einer Abflachung des Epithels. Auch das Lumen der Organoide war vermehrt mit abgestorbenem Zellmaterial gefüllt. Im Vergleich zu den Organoiden, die nur mit TNF α behandelt wurden, schienen die mit dem Zytokin-Mix inkubierten Organoide schneller und stärker anzuschwellen, was im Folgenden quantifiziert wurde.

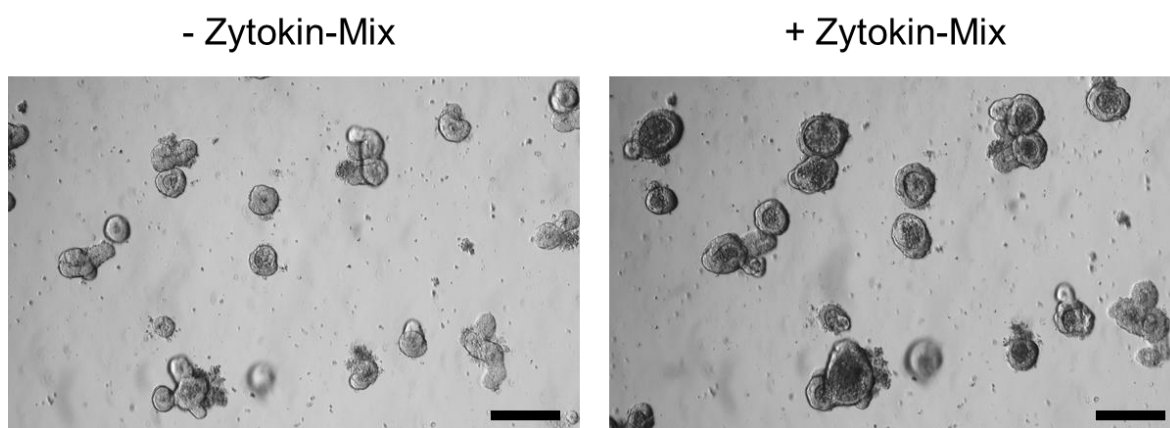


Abbildung 27: Organoide 24 h nach Inkubation mit dem Zytokin-Mix

Durchlichtaufnahmen von Organoiden vor (links) und 24 h nach Inkubation mit dem Zytokin-Mix (TNF α (100 ng/ml), IL-1 β (20 ng/ml) und IFN γ (100 pg/ml)) (rechts). Der Maßstab entspricht 200 μ m.

6.5.2 Zunahme der relativen Lumengröße

Um den Verlauf und die Stärke der durch den Zytokin-Mix induzierten Schwellung zu messen, wurden 24 h-Zeitrafferaufnahmen erstellt. Hierfür wurden unbehandelte Organoide (n = 14) und Organoide, die zu Beginn der Aufnahme mit dem Zytokin-Mix behandelt wurden (n = 15), untersucht und der Anstieg der relativen Lumengröße verglichen. Während bei den unbehandelten Organoiden die relative Lumengröße konstant blieb (18 ± 3 %) schwollen die mit dem Zytokin-Mix behandelten Organoide auf eine relative Lumengröße von 46 ± 3 % an (Abbildung 28). Damit war die mittlere maximale Schwellung nach 22 h Zytokin-Mix stärker als die Schwellung nach 22 h TNF α (vergl. Abbildung 20 und Abbildung 28). Auch verlief die Schwellungskurve nicht linear wie im Falle von TNF α (Abbildung 20), sondern näherte sich exponentiell mit einer Halbwertszeit von $6,4 \pm 0,95$ h dem Endwert (Abbildung 28).

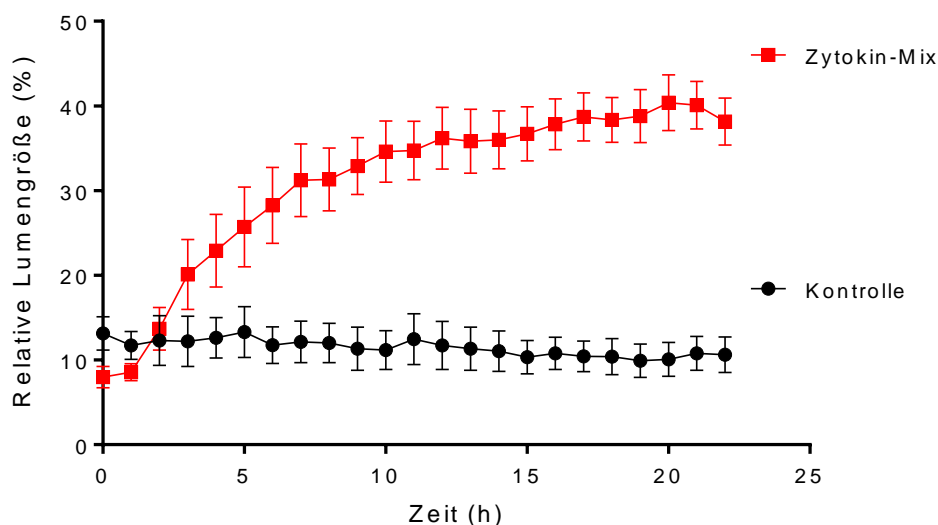


Abbildung 28: Durch den Zytokin-Mix induzierte Schwellung über 22 h

Änderung der relativen Lumengröße (Größe des Lumens/Größe des gesamten Organoids $\times 100$ %) über eine Zeit von 22 h bei unbehandelten Organoiden (schwarz) und Organoiden, die zu Beginn des Experiments mit dem Zytokin-Mix (TNF α (100 ng/ml) + IL-1 β (20 ng/ml) + IFN γ (100 pg/ml)) inkubiert wurden (rot). Daten sind gezeigt als relative Lumengröße in % \pm SEM von $n = 14 - 15$ Organoiden pro Gruppe aus je 3 unterschiedlichen Passagen.

6.5.3 Bumetanid reduziert die Zytokin-Mix induzierte Schwellung

Bei der durch TNF α induzierten Schwellung spielte der NKCC1 eine wichtige Rolle (siehe Abbildung 23). Um herauszufinden, ob dies bei der Inkubation mit dem Zytokin-Mix auch der Fall ist, wurde der Anstieg der relativen Lumengröße durch 1 d Zytokin-Mix Inkubation mit ImageJ ausgewertet. Es kam durch den Zytokin-Mix zu einem Anstieg der relativen Lumengröße um $29,2 \pm 2,1$ Prozentpunkte. Wurden die Organoiden zusätzlich noch mit Bumetanid (100 μ M) inkubiert, war diese Schwellung signifikant ($p < 0,05$) reduziert auf $17,2 \pm 1,9$ Prozentpunkte (Abbildung 29). Die Inkubation mit den Zytokinen und Indometacin, einem Blocker der Cyclooxygenase, hatte auch hier fast keinen Effekt auf die Stärke der Schwellung ($26,2 \pm 1,4$ Prozentpunkte).

Ergebnisse

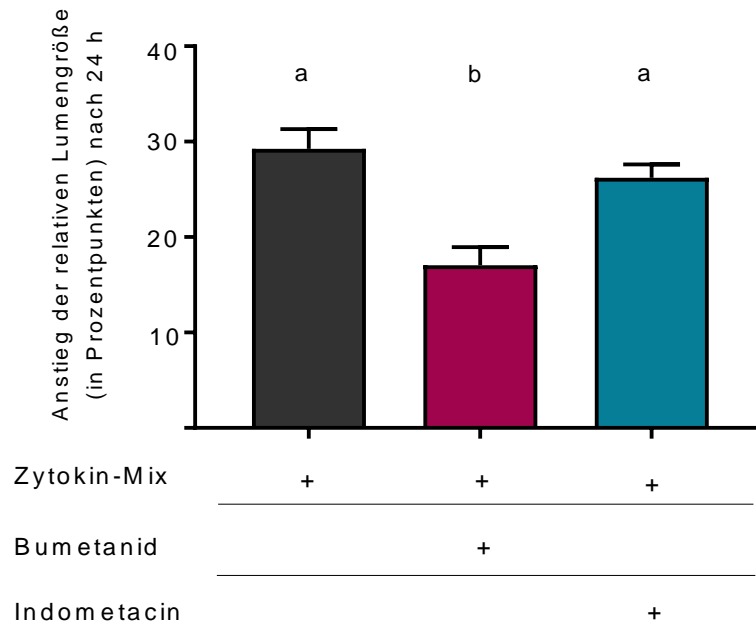


Abbildung 29: Bumetanid reduziert die Zytokin-Mix induzierte Schwellung

Anstieg der relativen Lumengröße (in Prozentpunkten) nach eintägiger Inkubation mit dem Zytokin-Mix (TNF α (100 ng/ml) + IL-1 β (20 ng/ml) + IFN γ (100 pg/ml)) verglichen mit Organoiden, die mit Zytokin-Mix + Bumetanid (100 μ M), und Organoiden, die mit Zytokin-Mix + Indometacin (100 μ M) behandelt wurden. Die Daten werden dargestellt als Differenz der relativen Lumengröße am Anfang und Ende des Experiments (24 h) und sind Mittelwerte + SEM. Es wurden $n = 30$ Organoide aus 3 unterschiedlichen Passagen pro Gruppe untersucht. Statistisch homogene Gruppen sind mit dem gleichen Buchstaben markiert ($p < 0,05$; ANOVA gefolgt von einem Tukey's Post-hoc-Test).

6.5.4 Genexpression von Anionenkanälen/-transportern

In qPCR-Versuchen konnte erneut NKCC1 und CFTR mRNA nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den nur mit TNF α inkubierten Organoiden (siehe Abbildung 21) war die Expression von NKCC1 nach Inkubation mit dem Zytokin-Mix für 3 d jedoch nur tendenziell erhöht, ohne dass dieser Effekt statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 30). Auch die Expression von CFTR war, wie auch im Fall von TNF α (Abbildung 21), nicht signifikant verändert. Eine Amplifikation der cDNA des Ca²⁺-abhängigen Cl⁻-Kanals TMEM16A konnte nur in etwa der Hälfte der Proben (unabhängig davon, ob die Proben von Kontroll- oder Zytokin-vorbehandelten Organoiden stammten) nachgewiesen werden und wurde daher nicht statistisch ausgewertet.

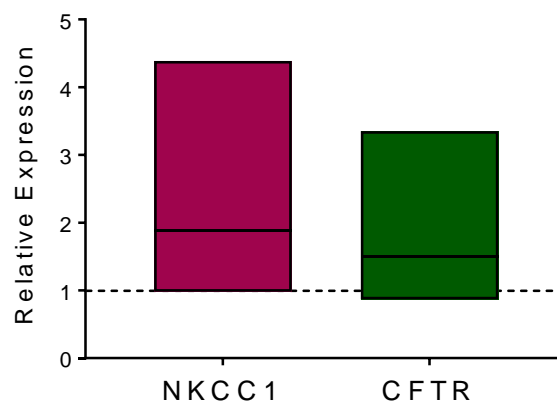


Abbildung 30: qPCR NKCC1 & CFTR

*Relative Expression von NKCC1 und CFTR von mit dem Zytokin-Mix (TNF α (100 ng/ml) + IL-1 β (20 ng/ml) + IFN γ (100 pg/ml) für 3 d) vorbehandelten Organoide verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (gestrichelte Linie bei 1). Die Ergebnisse wurden normalisiert zu den Referenzgenen Gapdh und Gusb. Die Daten werden gezeigt als arithmetisches Mittel (schwarze Linie) \pm 95 % Konfidenzintervall (Rechteck), n = 3 unterschiedliche Passagen, * p < 0,05 (analysiert mit REST2009).*

6.5.5 Einfluss auf die Epithelbarriere

Auch die Expression der Claudine 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 12 und 18 wurde in qPCR Versuchen gemessen, um zu sehen, ob der Zytokin-Mix zusätzlich zu einer modulierten Chloridsekretion auch einen Effekt auf die Epithelbarriere hat. Die Claudine 1, 5 und 18 konnten weder in den behandelten Organoiden noch in den Kontrollorganoiden nachgewiesen werden. Die Claudine 2, 7, 8 und 12 wurden trotz Inkubation mit dem Zytokin-Mix unverändert exprimiert. Die Expression der abdichtenden Claudine 3 und 4 war hingegen signifikant erhöht (Abbildung 31).

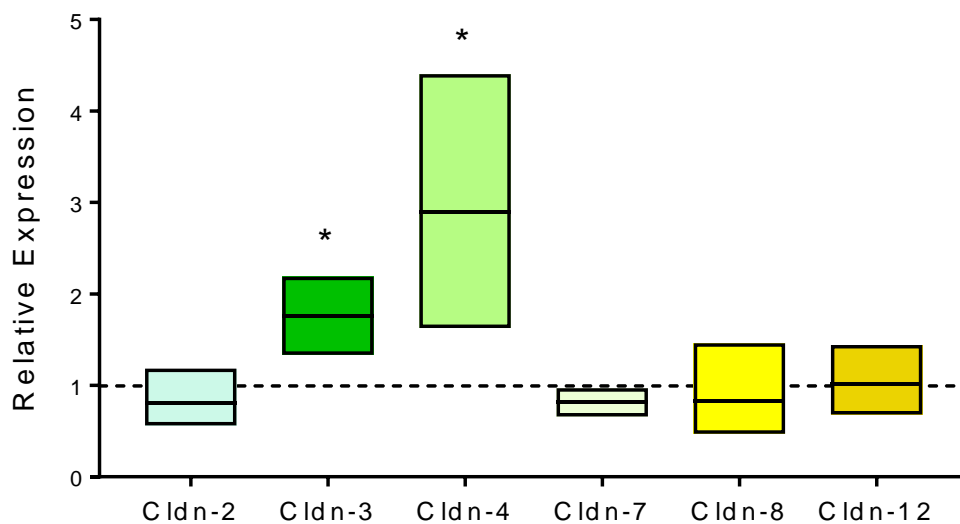


Abbildung 31: qPCR Claudine

Relative Expression der mit dem Zytokin-Mix (TNF α (100 ng/ml) + IL-1 β (20 ng/ml) + IFN γ (100 pg/ml) für 3 d) behandelten Organoide verglichen mit unbehandelten Kontrollorganoiden (gestrichelte Linie bei 1). Die Ergebnisse wurden normalisiert zu den Referenzgenen Gapdh und Gusb. Die Daten werden gezeigt als arithmetisches Mittel \pm 95 % Konfidenzintervall (Rechteck), $n = 3$ unterschiedlichen Passagen. * $p < 0,05$ (analysiert mit REST2009).

6.5.6 Ca²⁺-Imaging

Ob der Zytokin-Mix (TNF α (100 ng/ml) + IL-1 β (20 ng/ml) + IFN γ (100 pg/ml)) die zytosolische Ca²⁺-Konzentration moduliert, wurde mit Ca²⁺-Imaging Versuchen untersucht. Hierfür wurden die Organoiden 1 d, 3 d, oder 5 d mit den Zytokinen inkubiert. Das basale Fura-2 Ratio-Signal war sowohl in Standard Tyrode als auch in calciumfreier Tyrode nach 3 d und 5 d Inkubation mit dem Zytokin-Mix im Vergleich zu den Kontrollorganoiden signifikant reduziert (Tabelle 7).

In Standard Tyrode war die Antwort auf die Stimulation mit Carbachol (50 μ M) nach Zytokin-Mix-Inkubation für 1 d signifikant um etwa 50 % erhöht im Vergleich zu den unbehandelten Organoiden ($2,46 \pm 0,17$ vs. $1,62 \pm 0,09$). Nach 3 d oder 5 d Inkubation war dies nur noch als Tendenz zu messen (Abbildung 32 A, C, Tabelle 7).

In calciumfreier Tyrode war der durch Carbachol ausgelöste Peak in Organoiden, die 1 d mit dem Zytokin-Mix inkubiert wurden, ca. 40 % kleiner ($p < 0,05$) als in den unbehandelten Kontrollorganoiden. Dieser Effekt kehrte sich bei längerer Inkubationszeit um. Bei den 3 und 5 d inkubierten Organoiden war der Peak in Reaktion auf die Stimulation mit Carbachol signifikant größer (3 d: 80 %; 5 d: 45 %) verglichen mit den Kontrollorganoiden (vgl. Tabelle 7, Abbildung 32 B, D). Nach 3 d Zytokin-Mix war die Reaktion auf Carbachol interessanterweise in calciumfreier Tyrode stärker als in der Standard Tyrode (Tabelle 7), was eine vermehrte Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern vermuten lässt.

Tabelle 7: Ca²⁺-Imaging Zytokin-Mix

			Basales Fura-2 Ratio- Signal	Carbachol induzierter Peak (Δ Fura-2 Ratio)	Zellen, die auf Carbachol reagierten		
					%	n	
Standard Tyrode (Ca ²⁺ -haltig)	1 d	+ Z-Mix	3,23 ± 0,07	2,46 ± 0,17* ↑	100	60/60	
		- Z-Mix	3,14 ± 0,07	1,62 ± 0,09	100	62/62	
	3 d	+ Z-Mix	2,32 ± 0,06* ↓	1,25 ± 0,14	98	64/65	
		- Z-Mix	3,36 ± 0,07	1,01 ± 0,09	86	51/59	
	5 d	+ Z-Mix	2,25 ± 0,05* ↓	1,73 ± 0,08	100	61/61	
		- Z-Mix	3,12 ± 0,09	1,57 ± 0,10	96	55/57	
	Calcium- freie Tyrode	1 d	+ Z-Mix	2,56 ± 0,04 [#]	0,45 ± 0,03 ^{**} ↓	95	62/65
			- Z-Mix	2,68 ± 0,06 [#]	0,81 ± 0,05 [#]	76	53/70
3 d		+ Z-Mix	2,51 ± 0,07 ^{**} ↓	1,49 ± 0,08 ^{**} ↑	100	67/67	
		- Z-Mix	3,14 ± 0,06 [#]	0,85 ± 0,06	100	64/64	
5 d		+ Z-Mix	2,06 ± 0,07* ↓	1,31 ± 0,11 ^{**} ↑	100	61/61	
		- Z-Mix	2,84 ± 0,05 [#]	0,91 ± 0,07 [#]	98	65/66	

Die Wirkung von Carbachol ist als Anstieg des Fura-2-Signals gegenüber der Baseline direkt vor Zugabe des Agonisten (Δ Fura-2 Ratio) angegeben. Daten sind Mittelwerte ± SEM. * $p < 0,05$ (- Zytokin-Mix vs. + Zytokin-Mix); # $p < 0,05$ (Standard Tyrode vs. calciumfreie Tyrode). ↓↑ symbolisieren die Richtung der Änderung im Vergleich zu den Organoiden ohne Zytokinvorinkubation. n = Zellen aus Organoiden von 3 unterschiedlichen Passagen.

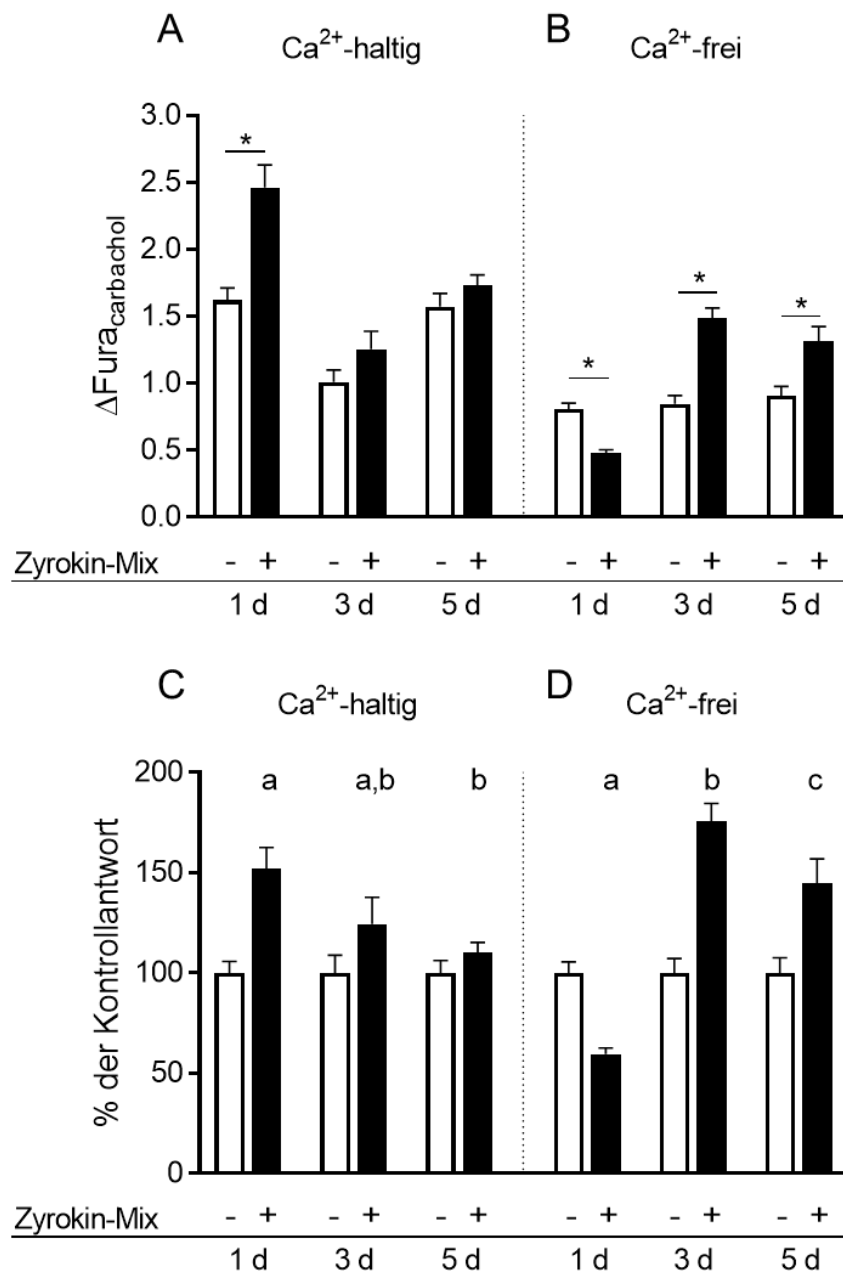


Abbildung 32: Modulation der Ca²⁺-Antwort auf Carbachol durch den Zytokin-Mix

Die Abbildung veranschaulicht den gemessenen Anstieg der Fura-2 Ratio ($\Delta Fura$) auf die Stimulation mit Carbachol (Tabelle 7) mit und ohne Zytokin-Mix Inkubation für 1, 3 oder 5 d in Ca²⁺-haltigem (A, C) und Ca²⁺-freiem (B, D) Puffer in absoluten Zahlen (A, B) sowie als %-Werte (C, D), wobei der Mittelwert der jeweiligen Kontrollgruppe ohne Zytokinexposition (weiße Säulen) auf 100 % gesetzt wurde. Die Daten sind Mittelwerte + SEM; * $p < 0,05$ +/- Zytokin-Mix; a/b/c = statistisch homogene Gruppen einer Versuchsreihe ($p < 0,05$; ANOVA gefolgt von einem Tukey's Post-hoc-Test).

6.5.6.1 Lanthan hemmt die Stimulation der Carbachol durch Zytokine

Nach 1 d Zytokin-Mix-Inkubation war der durch Carbachol induzierte Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration signifikant gesteigert, sofern Ca^{2+} im Extrazellulärraum vorhanden war (Tabelle 7). Um zu untersuchen, ob der vermutete Ca^{2+} -Einstrom über membranständige Kationenkanäle stattfindet, wurden in Analogie zu den Versuchen mit $\text{TNF}\alpha$ (Abbildung 25) nichtselektive Kationenkanäle mit La^{3+} blockiert (siehe 6.2.7.2). Die Vorbehandlung mit La^{3+} unterdrückte die Steigerung der Carbacholantwort durch Zytokine nicht komplett, die Steigerung um $0,12 \pm 0,06$ (von $0,37 \pm 0,04$ bei den Kontrollorganoiden auf $0,49 \pm 0,04$ bei den zytokinvorbehandelten Organoiden; Tabelle 8) fiel jedoch deutlich geringer aus als in Abwesenheit von Lanthan wo diese Steigerung $0,84 \pm 0,19$ betrug (von $1,62 \pm 0,09$ bei den Kontrollorganoiden auf $2,46 \pm 0,17$ bei den zytokinvorbehandelten Organoiden; vgl. Tabelle 7).

Tabelle 8: Ca^{2+} -Imaging mit La^{3+} -Vorbehandlung (Zytokin-Mix)

		Carbachol induzierter Peak ($\Delta\text{Fura-2 Ratio}$)	Zellen, die auf Carbachol reagierten	
			%	n
Standard Tyrode (Ca^{2+} -haltig)	+ Z-Mix	$0,49 \pm 0,04^*$ ↑	77	50/65
	- Z-Mix	$0,37 \pm 0,04$	74	45/61

Die Wirkung von Carbachol ist als Anstieg des Fura-2-Signals gegenüber der Baseline direkt vor Zugabe des Agonisten als $\Delta\text{Fura-2 Ratio}$ angegeben. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. $\downarrow\uparrow$ symbolisieren die Richtung der Änderung im Vergleich zu den Organoiden ohne Zytokinvorinkubation. Die Dauer der Zytokinexposition betrug 1 d. * $p < 0.05$ vs. Kontrollorganoiden ohne Zytokin-Mix Vorbehandlung. n = Zellen aus Organoiden von 3 unterschiedlichen Passagen.

Um zu evaluieren, ob diese Verminderung der stimulatorischen Wirkung des Zytokinmixes auf die Carbacholantwort durch La^{3+} statistisch signifikant ist, wurde eine lineare Kontrastanalyse durchgeführt. Dazu wurden die Steigerung der Carbacholantwort unter den beiden Bedingungen ($\pm \text{La}^{3+}$) zwischen den

zytokinvorbehandelten Organoiden und den jeweiligen Kontrollorganoiden berechnet (siehe oben) und miteinander verglichen (Abbildung 33). In der Tat ergab diese Analyse, dass La^{3+} die Stimulation der Carbacholantwort durch die drei Zytokine signifikant vermindert (Abbildung 33).

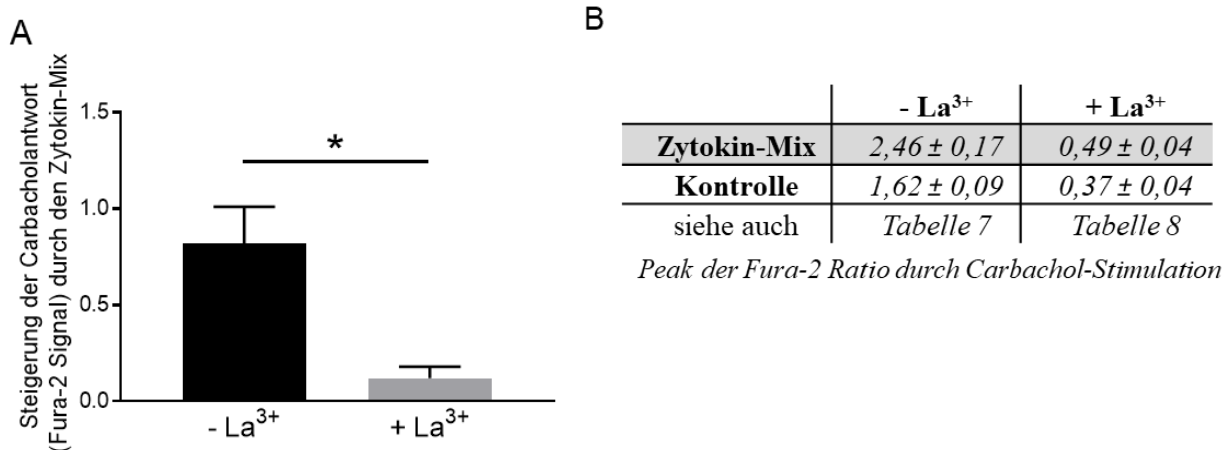


Abbildung 33: Anstieg der Ca^{2+} -Antwort durch den Zytokin-Mix

*A) Steigerung der Carbacholantwort nach 1 d Zytokin-Mix im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen in Anwesenheit und Abwesenheit von Lanthan. Daten sind Mittelwerte + SEM. Die Streuung der errechneten Differenzen wurde über das Gauss'sche Fehlerfortpflanzungsgesetz berechnet. Die Signifikanz * $p < 0,05$ wurde berechnet durch eine Lineare Kontrastanalyse mittels Scheffé Test. Die Tabelle (B) zeigt die ursprünglichen Werte (aus Tabelle 7 und Tabelle 8), deren Differenzen analysiert wurden.*

6.5.6.2 Modulation des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms

Die Tatsache, dass der Zytokin-Mix auch in calciumfreiem Medium die Carbacholantwort beeinflusst (Tabelle 7, Abbildung 32 B, D), spricht für eine Modulation der Funktion der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher durch die drei Zytokine. Der Füllungszustand der Speicher beeinflusst über den so genannten kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom die Ca^{2+} -Aufnahme in die Zelle, wodurch Ca^{2+} zur Wiederauffüllung der Speicher zur Verfügung steht. Um diesen Vorgang zu untersuchen, wurden Depletions-/Repletionsversuche (Rosado und Sage 2001) durchgeführt. Bei diesen Versuchen wird

in calciumfreiem Medium eine Speicherentleerung ausgelöst. Wenn dann Ca^{2+} wieder im Extrazellulärraum substituiert wird, kommt es zu einem massiven Einstrom von Ca^{2+} über speichergesteuerte Ca^{2+} -Kanäle, was als Anstieg der Fura-2 Ratio messbar ist.

Um die Speicher zu entleeren, wurde nach 3 min stabiler Baseline in calciumfreier Tyrode Thapsigargin, ein potenter Blocker von SERCAs (Takemura et al. 1989), in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ hinzugegeben. Ca. 12 min nach der Zugabe von Thapsigargin wurde CaCl_2 ($2,5 \text{ mM}$) appliziert. Dies führte zu einem schnellen Anstieg des Fura-2-Signals (Abbildung 34). Die Größe des durch CaCl_2 induzierten Peaks, d.h. der Ca^{2+} -Einstrom von extrazellulär, wurde ausgewertet. Obwohl zu keinem Zeitpunkt (1, 3 oder 5 d Zytokinexposition) die Amplitude des Ca^{2+} -induzierten Anstiegs des Fura-2-Signals signifikant verändert war (Tabelle 9), kam es numerisch nach 1 d zu einer Zunahme, sprich einer angedeuteten Steigerung des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms, die gut mit der zum gleichen Zeitpunkt beobachteten Hemmung des Carbachol-Effekts durch La^{3+} (Abbildung 33) vereinbar ist. Diese (numerische) Erhöhung des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms ging bei längerer Zytokinexposition ($\geq 3 \text{ d}$) in eine (numerische) Verminderung über (Tabelle 9).

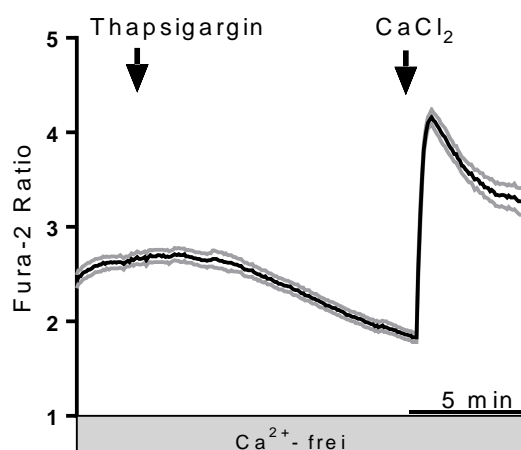


Abbildung 34: Ca^{2+} -Depletion/Repletion mit Thapsigargin

Repräsentative Kurve des Effekts von Thapsigargin ($1 \mu\text{M}$) und CaCl_2 ($2,5 \text{ mM}$) auf Organoide in calciumfreier Tyrode. Die Daten sind Mittelwert (schwarze Linie) \pm SEM (graue Linien), $n = 13$ Zellen in einem Organoid, Statistik siehe Tabelle 9.

Tabelle 9: Ca²⁺-Depletion/Repletionsversuche

			CaCl ₂ induzierter Peak (Δ Fura-2 Ratio)	Zellen, die auf CaCl ₂ reagierten	
				%	n
Calciumfreie Tyrode	1 d	+ Z-Mix	1,61 ± 0,10	100	96/96
		- Z-Mix	1,38 ± 0,07	98	87/89
	3 d	+ Z-Mix	1,62 ± 0,08	100	54/54
		- Z-Mix	1,83 ± 0,08	100	54/54
	5 d	+ Z-Mix	1,06 ± 0,06	100	65/65
		- Z-Mix	1,34 ± 0,14	100	63/63

Die Wirkung von CaCl₂ nach Ca²⁺-Depletion ist als Anstieg des Fura-2-Signals gegenüber der Baseline direkt vor Zugabe von Ca²⁺ (Δ Fura-2 Ratio) angegeben. Daten sind Mittelwerte ± SEM. n = Zellen aus Organoiden von 3 unterschiedlichen Passagen.

6.5.7 Rezeptoren und Transporter der intrazellulären Ca²⁺-Speicher

Die Ca²⁺-Imaging-Daten lassen vermuten, dass der Zytokin-Mix sowohl die Freisetzung von Ca²⁺ aus zellulären Speichern als auch den Influx von Ca²⁺ über die Plasmamembran moduliert. Um dem nachzugehen, wurden qPCR-Experimente durchgeführt. Hierbei wurde die Expression von an der Füllung oder Entleerung der Speicher beteiligten Strukturen wie IP₃-Rezeptoren, Ryanodinrezeptoren, SERCA, STIM und ORAI bestimmt (Abbildung 7). Weder die mRNA für Ryanodinrezeptor 1, -2 und -3 noch SERCA1 konnten in den Organoiden nachgewiesen werden. Auch ORAI2 konnte nur in knapp der Hälfte der Messungen (Kontrollen und Zytokin-Mix) nachgewiesen werden und wurde daher statistisch nicht ausgewertet. Sowohl das am SOCE beteiligte STIM2 als auch der für den Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER in das Zytosol beteiligte IP₃-Rezeptor 1 (IP₃R1) zeigten auf mRNA-Ebene in den für 3 d mit dem Zytokin-Mix inkubierten Organoiden eine erhöhte Expression (Abbildung 35). Im Gegensatz dazu wurde SERCA3 in den behandelten Organoiden signifikant geringer

exprimiert ($p < 0,05$). Die Gene IP_3R2 , IP_3R3 , $SERCA2$, $STIM1$ und $ORAI1$ wurden trotz Inkubation mit dem Zytokin-Mix unverändert exprimiert.

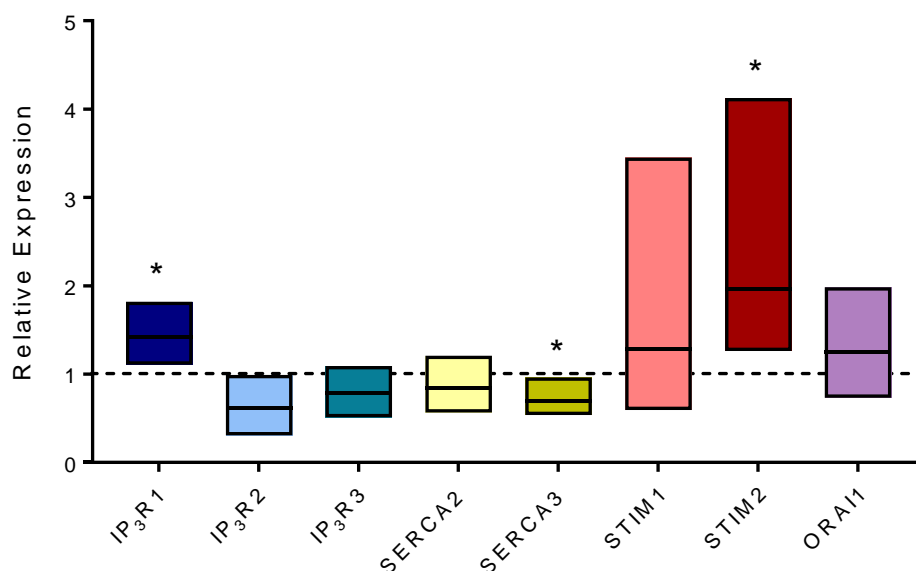


Abbildung 35: qPCR Ca^{2+} -Speicher

Relative Expression der mit dem Zytokin-Mix ($TNF\alpha$ (100 ng/ml) + $IL-1\beta$ (20 ng/ml) + $IFN\gamma$ (100 pg/ml)) über 3 d behandelten Organoide verglichen mit unbehandelten Kontrollorganoiden (gestrichelte Linie bei 1). Die Ergebnisse wurden normalisiert zu den Referenzgenen $Gapdh$ und $Gusb$. Die Daten werden gezeigt als arithmetisches Mittel (schwarze Linie) \pm 95 % Konfidenzintervall (Rechtecke), $n = 3$ unterschiedliche Passagen. * $p < 0,05$ (analysiert mit REST2009).

6.5.8 Rezeptoren und Proteine der cholinergen Signalkaskade

Die vorherigen Versuche zeigten, dass es tatsächlich durch die Wirkung der Zytokine nach 3 d Inkubation zu veränderten mRNA Expressionen wichtiger Strukturen der Ca^{2+} -Speicher kommt. Dies allein kann jedoch nicht die zuvor beobachteten Veränderungen des Ca^{2+} -Signals in Reaktion auf die Stimulation der Zellen mit Carbachol erklären (Tabelle 7, Abbildung 32). Deshalb wurde auch die Expression von

den, dem Ca^{2+} -Speicher vorgeschalteten Strukturen der Signalkaskade mittels qPCR untersucht.

Sowohl der Acetylcholinrezeptor M_3 als auch das damit gekoppelte G_q -Protein α sowie das im Nachfolgenden aktivierte Enzym Phospholipase $C\beta_3$ (PLC β_3), welches Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$) hydrolysiert, waren nach 3 d Inkubation mit dem Zytokin-Mix signifikant reduziert ($p < 0,05$; Abbildung 36). Die muskarinergen Rezeptoren M_1 und M_2 konnten in den qPCR Experimenten nicht in allen Proben nachgewiesen werden und sind daher hier nicht dargestellt.

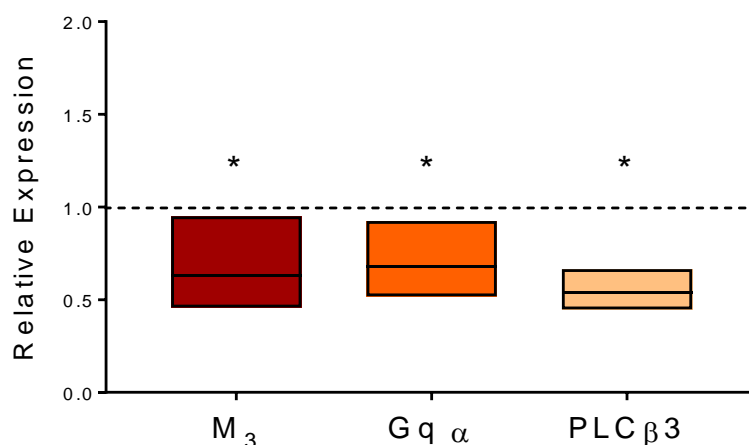


Abbildung 36: qPCR M_3 -Rezeptor und Signalkaskade

Relative Expression der mit dem Zytokin-Mix (TNF α (100 ng/ml) + IL-1 β (20 ng/ml) + IFN γ (100 pg/ml)) über 3 d behandelten Organoide verglichen mit unbehandelten Kontrollorganoiden (gestrichelte Linie bei 1). Die Ergebnisse wurden normalisiert zu den Referenzgenen *Gapdh* und *Gusb*. Die Daten werden gezeigt als arithmetisches Mittel (schwarze Linie) \pm 95 % Konfidenzintervall (Rechtecke), $n = 3$ unterschiedliche Passagen. * $p < 0,05$ (analysiert mit REST2009).

7. Diskussion

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Inflammatory bowel disease, IBD) haben eine komplexe Pathogenese, die noch nicht vollständig geklärt ist. Viele Umwelteinflüsse und genetische Faktoren spielen in der Entstehung von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa eine große Rolle (Kaplan und Ng 2017; Guan 2019), doch letztendlich scheint die wiederholte Stimulation des Immunsystems und die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen in Kombination mit einer fehlenden Eindämmung der Immunreaktion der Grund für die Chronizität der Krankheiten zu sein (Strober et al. 2007). Der Pathomechanismus von IBD wurde bisher experimentell v.a. an Kolitis- oder Enteritismodellen untersucht, indem Versuchstieren z.B. DSS oder TNBS verabreicht wurde, die durch Schädigung des Kolonepithels bzw. Wirkung als Hapten eine Entzündung auslösen (Bauer et al. 2010; Steidle et al. 2013; Becker et al. 2019). Diese Modelle gehen mit Schmerzen, Leiden und Schäden für die Versuchstiere einher, weshalb im Sinne der 3R-Prinzipien (Replacement, Reduction, Refinement; Russell und Burch 1960) Alternativen u.a. in Form von In-vitro-Modellen verwendet werden sollten. Viel genutzte In-vitro-Modelle für das Darmepithel sind Zelllinien wie HT-29 oder Caco-2 (Bode et al. 1998; Vallee et al. 2004). Diese haben allerdings den Nachteil, dass sie nicht die Vielfalt der verschiedenen Zelltypen in der Epithelschicht der Mukosa widerspiegeln und meist einen tumorösen Ursprung haben. Alternativ wäre die Verwendung von Primärkulturen denkbar, welche aber nicht sehr langlebig sind und meist nur für Stunden bis wenige Tage kultiviert werden können (Aldhous et al. 2001; Kaeffer 2002). Intestinale Organoide sind dagegen Zellkulturen, die diese Nachteile nicht mit sich bringen und durch ihre 3D-Struktur ein deutlich komplexeres Modell darstellen als herkömmliche Zelllinien (Foulke-Abel et al. 2016). Ziel meiner Arbeit war es, anhand eines Organoidmodells aus dem Dünndarm die Effekte proinflammatorischer Zytokine, einzeln oder in Kombination, auf das Darmepithel zu untersuchen. So könnten sowohl neue Erkenntnisse im Hinblick auf chronisch-entzündliche Darmerkrankungen anhand von Dünndarmorganoiden gewonnen sowie der Einsatz von Versuchstieren deutlich reduziert werden.

7.1 Intestinale Organoide und ihr Einsatz als Entzündungsmodell

Histologische (HE, PAS) und Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass das Organoidmodell aus dem Jejunum von 5 - 9 Tage alten Mäusen morphologisch in den untersuchten Aspekten dem nativen Dünndarmepithel entspricht (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16). Zusätzlich zu der PAS-Färbung konnte auch mit qPCR Versuchen über den Nachweis der Mucin 2-Expression (Abbildung 21) das Vorhandensein von Becherzellen bestätigt werden. Dass die Zellzusammensetzung von Darmorganoiden dies des nativen Darmepithels widerspiegelt, zeigten als erstes Sato et al. (2009). Die Funktionalität meiner Organoidkultur konnte durch die Reaktion auf die Stimulation mit den Sekretagen Carbachol und PGE₂ nachgewiesen werden (Abbildung 17). Dass Organoide über funktionelle cholinerge Rezeptoren verfügen, wurde bereits in früheren Studien gezeigt (Johnson et al. 2020). In meinen Versuchen stellte sich heraus, dass das über cAMP wirkende PGE₂ (1 µM) eine deutlich stärkere und schnellere Sekretion auslöst als Carbachol (50 µM), welches über den Second Messenger Ca²⁺ wirkt (Dharmasathaphorn und Pandol 1986). Zu dem Ergebnis, dass PGE₂ eine stärkere Sekretion auslöst, kamen auch Fujii et al. (2016), welche u.a. die Effekte von PGE₂ (10 nM) und Acetylcholin (1 mM) auf humane Dünndarmorganoide testeten.

Nachdem die grundsätzliche Funktionalität der Organoide als Modell für das Darmepithel gezeigt worden war, ging es in meinem Projekt darum, daraus ein In-vitro-Modell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen zu entwickeln. Dazu wurden die Organoide mit proinflammatorischen Zytokinen inkubiert, welche in erhöhten Konzentrationen in Blut- und Gewebeproben von IBD Patienten und Koltistieren gefunden wurden (Pérez-Navarro et al. 2005; Singh et al. 2016; Nakase et al. 2022). Die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β wurden in Konzentrationen eingesetzt, wie sie in In-vitro-Untersuchungen in der Literatur (Barmeyer et al. 2004) bzw. in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe (Ballout und Diener 2019) verwendet wurden. Die Konzentration von IFN γ hingegen wurde reduziert um die Vitalität der Organoide zu gewährleisten. Durch die Inkubation mit den Zytokinen zeigten die Dünndarmorganoide sowohl morphologische (Abbildung 18 und Abbildung 27) als

auch funktionelle Änderungen, die auch durch entzündliche Prozesse im Darm beeinflusst werden. Besonders auffällig war die kugelige Form, welche die Organoide nach Inkubation mit TNF α oder dem Zytokin-Mix annahmen. Solch ein „Anschwellen“ von intestinalen Organoiden wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Hahn et al 2017, Xing et al. 2023), doch der Grund hierfür war bisher nicht geklärt. Denkbare Mechanismen könnten sein: eine geschädigte Epithelbarriere, die den passiven Einstrom von Wasser in das Organoidlumen ermöglicht, eine erhöhte Apoptoserate, die über eine erhöhte Menge an (osmotisch wirksamen) Zellmaterial im Lumen das Organoid passiv dehnt, oder die aktive Sekretion von Elektrolyten und damit auch von Wasser in das Organoidlumen.

7.2 Effekte der Zytokine auf die Epithelbarriere

7.2.1 Claudine

Um den Einfluss der Zytokine auf die Epithelbarriere zu beurteilen, wurde die Expression von verschiedenen abdichtenden und porenbildenden Claudinen in qPCR Experimenten untersucht. Claudine sind Transmembranproteine, die als Bestandteil der Tight Junctions die Permeabilität der parazellulären Epithelbarriere beeinflussen (Günzel und Yu 2013). Während bei alleiniger Inkubation mit TNF α keine Unterschiede in der Expression von Claudin 2 und 3 festgestellt werden konnten, waren nach Inkubation mit dem Zytokin-Mix paradoxerweise die abdichtenden Claudine 3 und 4 vermehrt exprimiert (Abbildung 31). Dies steht im Kontrast zu bekannten Ergebnissen aus der Literatur, in denen viele abdichtende Claudine bei entzündlichen Geschehen signifikant reduziert exprimiert werden (Prasad et al. 2005; Garcia-Hernandez et al. 2017). Jedoch konnte auch Weber et al. (2008) eine erhöhte Expression von Claudin 4 in Biopsien von IBD Patienten nachweisen.

Interessanterweise war das porenformende Claudin 2 auch nach 3 d Zytokin-Mix-Inkubation nicht vermehrt exprimiert, was überraschend war, da Claudin 2 häufig bei entzündlichen Geschehen im Darm verstärkt exprimiert wird (Luettig et al. 2015). Andererseits konnten Gleeson et al. (2020) ebenfalls keine veränderte Expression von Claudin 2 in humanen Darmorganoiden feststellen, welche zuvor 72 h mit jeweils 10 ng/ml TNF α und IFN γ inkubiert worden waren. Insgesamt wurden in meinem Projekt bei der Betrachtung der Claudine nur Hinweise gefunden, welche vermuten lassen, dass der Zytokin-Mix die Epithelbarriere stärkt und nicht etwa durchlässiger macht. Zu bedenken ist jedoch, dass bei den Organoiden wichtige subepithelial gelegene Zelltypen wie Neurone und Gliazellen des enterischen Nervensystem und insbesondere Immunzellen, wie z.B. Lymphozyten, Mastzellen oder Gewebemakrophagen, fehlen. Diese Zelltypen können über Neurotransmitter (z.B. Acetylcholin; Cameron und Perdue 2007) oder parakrine Substanzen (z.B. Proteasen; Jacob et al. 2005) die Permeabilität des Darmepithels regulieren und werden ihrerseits durch proinflammatorische Zytokine stark beeinflusst (Keita und Söderholm 2010; van Spaendonk et al. 2017).

7.2.2 Mucine

Die Epithelbarriere wird in gesunden Individuen durch die von Becherzellen produzierte Mucusschicht vor dem Eindringen von Bakterien in die Darmwand geschützt (Hansson 2012). Bei einer Entzündung des Darmepithels z.B. durch Colitis ulcerosa ist die Mucinschicht jedoch nicht in der Lage, das Eindringen der Bakterien zu verhindern (Johansson et al. 2014). In qPCR-Experimenten zeigte sich, dass Mucin 2 (Muc2), ein Hauptbestandteil des Mucus (Johansson et al. 2011), nach 5 d Inkubation mit TNF α signifikant reduziert exprimiert wurde (Abbildung 21). Die Studienlage zu dem Effekt von TNF α auf die Muc2-Bildung in der Darmschleimhaut ist sehr divers. Während einige Autoren eine erhöhte Expression nach Behandlung mit TNF α (5 - 10 ng/ml für 16 - 48 h) feststellten (Iwashita et al. 2003; Li et al. 2018), wurde in anderen Studien eine verminderte Expression gemessen (TNF α eingesetzt mit 15 - 30 ng/ml für 3 - 96 h; Onozato et al. 2021; Saito et al. 2021b). McElroy et al. (2011) zeigten, dass eine erhöhte Expression von Muc2 durch TNF α Injektion erst ab einem

Alter von mind. 14 d in Mäusen nachweisbar ist. Bei jüngeren Tieren (Alter < 14 d post partum) reduzierte TNF α hingegen die Anzahl der Becherzellen signifikant. Wenngleich die Anzahl der Becherzellen in den PAS-Färbungen (Abbildung 15) nicht vermindert zu sein schien, könnte dies doch eine mögliche Ursache für die verminderte Muc2 Expression in den mit TNF α behandelten Organoiden sein, da die Organoide aus Mäusen gewonnen wurden, welche < 10 d alt waren.

7.3 Apoptose

Die Zellen des Darmepithels gehen physiologischerweise nach etwa 5 Tagen, in denen sie von der Kryptenbasis des Epithels in Richtung Villi wandern und sich in die spezifischen Zelltypen differenzieren, in den programmierten Zelltod (van der Flier und Clevers 2009). TNF α kann unabhängig von diesem physiologischen Prozess die Apoptoserate der Zellen drastisch erhöhen. Auf welche Wege TNF α dies induzieren kann, ist relativ gut untersucht (van Loo und Bertrand 2023). Die Bindung von TNF α an den TNF-Rezeptor 1 und die dadurch ablaufende Signalkaskade führt letztendlich zur Aktivierung der Caspase 3 (Abbildung 4). Dies stellt einen „Point-of-no-return“ bei dieser Form des programmierten Zelltods dar. Daher bietet sich die aktivierte Caspase 3 als Marker für apoptotische Zellen an. In der Tat ließ die Inkubation mit TNF α schon innerhalb eines Tages die Anzahl von apoptotischen Zellen in den Organoiden signifikant ansteigen (Abbildung 19). Jones et al. (2019) konnten ähnliche Ergebnisse vorweisen bei Versuchen mit Organoiden, die von Mäusen, welche mit 0,33 mg/kg TNF α intraperitoneal behandelt worden waren, gewonnen wurden. Zusätzlich konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass, obwohl die Anzahl an Caspase 3 positiven Zellen signifikant ansteigt, die Anzahl an Ki67 positiven Zellen, einem Marker für die Proliferation, gleichbleibt (Jones et al. 2019). In meinen Versuchen war auch mikroskopisch die vermehrte Ansammlung von abgestorbenem Zellmaterial im Lumen der Organoide nach der Inkubation mit TNF α zu erkennen. Dass diese so stark war, dass

sie eine passive Ausdehnung der Organoide zur Folge hatte, ist jedoch eher unwahrscheinlich, da nicht alle angeschwollenen Organoide vollständig mit totem Zellmaterial gefüllt waren (Abbildung 18).

7.4 Einfluss der Zytokine auf die Sekretion

Das Darmepithel kann nicht nur Wasser und Elektrolyte resorbieren, sondern auch Ionen, wie z.B. Cl^- , aktiv in das Darmlumen sezernieren. Zentral daran beteiligte Ionentransporter sind ein Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Cotransporter (NKCC1) in der basolateralen Membran und Cl^- -Kanäle in der apikalen Membran (Abbildung 6). In qPCR-Experimenten konnte ich die Expression des NKCC1 sowie des cAMP-abhängigen Cl^- -Kanals CFTR in den Organoiden nachweisen. Nach 5 d Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$ war die Expression des NKCC1 signifikant erhöht verglichen mit unbehandelten Organoiden (Abbildung 21). Dieser Effekt von $\text{TNF}\alpha$ auf die Expression des NKCC1 wurde bereits in humanen Endothelzellen der Nabelschnur (Topper et al. 1997) sowie in Astrozyten der Ratte (Huang et al. 2014) gezeigt. Auch Pozdeev et al. (2017) beschreiben, dass die Expression des NKCC1 im Gehirn von $\text{TNF}\alpha$ defizienten Mäusen ($\text{Tnfa}^{-/-}$) reduziert ist und in Wildtyp-Mäusen nach Injektion von 200 ng $\text{TNF}\alpha$ ansteigt. Dass der NKCC1 nach 3 d Inkubation mit dem Zytokin-Mix nicht signifikant erhöht exprimiert wurde (Abbildung 30), könnte an der Beteiligung von $\text{IFN}\gamma$ liegen. Topper et al. (1997) zeigten, dass $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ einzeln die Expression des NKCC1 erhöhen, dieser Effekt jedoch verschwindet, wenn humane Endothelzellen der Nabelschnur zuvor mit $\text{IFN}\gamma$ inkubiert wurden.

Dass der NKCC1 jedoch nicht nur bei der durch $\text{TNF}\alpha$, sondern auch bei der durch den Zytokin-Mix induzierten Schwellung funktionell von zentraler Bedeutung ist, zeigen Experimente mit Bumetanid (Abbildung 23 und Abbildung 29), einem Blocker von Na^+ - K^+ - 2Cl^- Cotransportern (Zhao et al. 2022). Das Anschwellen der Organoide wurde etwa um die Hälfte reduziert, wenn die Zytokine in Gegenwart von Bumetanid

appliziert wurden (Abbildung 23 und Abbildung 29). Die Ergebnisse belegen, dass der NKCC1 durch die Zytokine, insbesondere TNF α , beeinflusst wird und für die erhöhte Sekretion des Epithels verantwortlich (oder mitverantwortlich) ist. Das Unterbinden der PGE₂-Produktion durch den COX-Blocker Indometacin hatte hingegen kaum Einfluss auf die Sekretion (Abbildung 23), obwohl andere Studien gezeigt haben, dass TNF α im humanen distalen Kolon die Cl⁻-Sekretion über PGE₂ verstärkt (Schmitz et al. 1996). Auch meine Vorversuche konnten eindeutig demonstrieren, dass auch PGE₂ in der Lage ist, eine starke Sekretion an den Organoiden auszulösen (Abbildung 17). Dass TNF α an den Organoiden nicht über PGE₂ die Sekretion moduliert, könnte daran liegen, dass Prostaglandine hauptsächlich in subepithelialen Zellen wie Myofibroblasten produziert werden (Craven und DeRubertis 1986; Beltinger et al. 1999) und diese in meinem Organoidmodell nicht vorhanden sind. Der cAMP-abhängigen Signalweg, welcher die Chloridsekretion über den CFTR-Kanal aktiviert, scheint ebenfalls nicht durch TNF α oder den Zytokin-Mix beeinflusst zu werden. Dies lässt sich aus der Beobachtung schließen, dass sich die Sekretion auf Stimulation mit dem cAMP-abhängigen Sekretagog Forskolin, der als Vitalitätskontrolle am Ende der 24 h Schwellungsversuche verwendet wurde (siehe 6.2.3), nach Zytokinexposition nicht veränderte.

Die Kombination der drei Zytokine TNF α , IL-1 β und IFN γ löste im Vergleich zur alleinigen Gabe von TNF α eine deutlich stärkere Schwellung aus (Zunahme des relativen Organoidlumens um ca. 30 Prozentpunkte im Vergleich zu 20 Prozentpunkten bei alleiniger Gabe von TNF α ; Abbildung 23 und Abbildung 29). Zudem erfolgte die Schwellung wesentlich schneller (vgl. Abbildung 20 und Abbildung 28). Dies lässt die Vermutung zu, dass IL-1 β und/oder IFN γ synergistisch mit TNF α die Sekretion verstärken. Bode et al. (1998) zeigten bereits in Ussingkammerversuchen mit humanem Kolon, dass IL-1 β konzentrationsabhängig den Kurzschlussstrom (also die Anionensekretion) erhöht, es sich dabei aber vermutlich um Effekte auf subepitheliales Gewebe und nicht auf das Epithel direkt handelt. Dies würde erklären, warum in meinem Organoidmodell bei alleiniger Inkubation mit IL-1 β zumindest anhand der mikroskopischen Betrachtung der Lumengröße keine erhöhte Sekretion erkennbar war.

Aus der Literatur ist bekannt, dass IFN γ die Expression der TNF-Rezeptoren in verschiedenen Zelllinien (z.B. HT-29 und Caco-2) erhöhen kann (Ruggiero et al. 1986; Tsujimoto et al. 1986; Wang et al. 2006). Eine vermehrte Expression von TNF-Rezeptoren an den Epithelzellen könnte die Effekte von TNF α auf die Sekretion in das Organoidlumen verstärken und den schnelleren Verlauf sowie die stärkere Schwellung der Organoide erklären.

7.5 Modulation der Ca²⁺-Antwort

7.5.1 Bedeutung des zytosolischen Ca²⁺ für die Regulation der Sekretion

Ein Merkmal von vielen experimentellen In-vivo-Kolitismodellen ist eine Herunterregulation der sekretorischen Antwort, die durch das stabile Acetylcholinderivat Carbachol hervorgerufen wird (Pérez-Navarro et al. 2005). Carbachol stimuliert, vermittelt über epitheliale G_q-Protein-gekoppelte M₃ (und auch M₁)-Rezeptoren, eine Aktivierung der Phospholipase C gefolgt von einem Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration (Keely und Barrett 2022). Auch in Experimenten der eigenen Arbeitsgruppe (Becker et al. 2019) war der Zeitverlauf der Carbachol-induzierten Sekretion bei Kolonpräparaten, die von mit TNBS-vorbehandelten Ratten isoliert worden waren, verändert. Der Carbachol-induzierte Kurzschlussstrom, der ein Maß für den Nettoionentransport darstellt, fällt normalerweise mit einem biexponentiellen Verhalten ab (Strabel und Diener 1995). Dies kommt daher, dass Carbachol initial eine transiente Ca²⁺-Freisetzung aus Speichern initiiert, dem ein langsam abklingender Ca²⁺-Einstrom von außen folgt, was sich im Zeitverlauf der Carbachol-induzierten Sekretion direkt widerspiegelt. Die Zeitkonstante der initialen Phase war bei Epithelzellen, die aus Tieren mit einer TNBS-induzierten Kolitis isoliert worden waren, deutlich verkürzt (Becker et al. 2019).

Ein Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration löst in der Hauptsache eine Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen und somit eine Hyperpolarisation der Membran aus (Böhme et al. 1991). Dies erhöht die Antriebskraft für den Chloridausstrom über die apikale Membran. Deren Chloridpermeabilität wird v.a. durch den cAMP-abhängigen CFTR-Kanal bestimmt (Abbildung 6). Allerdings wurde bei vielen Kolitismodellen ein Abfall der cAMP-Konzentration in den Epithelzellen gemessen. So haben Sánchez de Medina et al. (2002) detailliert nachgewiesen, dass es bei Kolitis zu einem Abfall der cAMP-Produktion in den Epithelzellen kommt, wahrscheinlich – wie Experimente mit dem Neurotoxin Tetrodotoxin nahelegen – dadurch, dass die Stimulation des Epithels durch prosekretorische Neurone des enterischen Nervensystems vermindert wird. Daher ist bislang unklar, ob die Herunterregulation der Ca^{2+} -abhängigen Sekretion auf Änderungen im Ca^{2+} -Signaling zurückgeht oder indirekt durch die Veränderung des cAMP-Spiegels bedingt ist. Denn andere Forscher berichten hingegen von einer Potenzierung der Ca^{2+} -abhängigen Sekretion nach Vorinkubation (3 - 72 h) mit $\text{TNF}\alpha$ z.B. in HT29cl.19A-Zellen (Oprins et al. 2000). Auch in den Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe war in den Kolitistieren die Amplitude der Carbachol-induzierten Kurzschlussstromantwort (als Maß für die Chloridsekretion) keinesfalls erniedrigt (Becker et al. 2019).

7.5.2 Veränderung des Ca^{2+} -Signaling durch Zytokine

Die intestinalen Organoide boten sich daher an, um in Ca^{2+} -Imaging Versuchen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 herauszufinden, ob proinflammatorische Zytokine direkt mit den Ca^{2+} -Signalwegen in den Epithelzellen interferieren. Die Organoide, welche nur mit $\text{TNF}\alpha$ inkubiert wurden, zeigten nach 3 d keinesfalls einen Abfall der Ca^{2+} -Antwort auf Carbachol, sondern das Fura-2 Ratio-Signal wurde im Gegenteil sogar stärker angehoben als bei den unbehandelten Kontrollorganoiden (Abbildung 24). Dass in meinen Versuchen der verstärkte Ca^{2+} Einstrom nach $\text{TNF}\alpha$ durch Carbachol in calciumfreier Tyrode nicht mehr messbar war (Tabelle 3, Abbildung 24), lässt vermuten, dass $\text{TNF}\alpha$ den Ca^{2+} -Einstrom über plasmamembranständige Ca^{2+} -Kanäle moduliert und nicht die Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern. Um den Ursprung des

erhöhten Ca^{2+} -Einstroms einzugrenzen, wurden nichtselektive Kationenkanäle, die eine zentrale Rolle beim kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom an nichterregbaren Zellen wie Darmepithelzellen spielen (Frings et al. 1999), mit Lanthan (La^{3+}) blockiert. Paradoxerweise kam es durch die Zugabe von La^{3+} zu einem kurzfristigen Anstieg im Fura-2-Signal, also zu einer transienten Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Abbildung 25). Dieses Phänomen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass einige TRP-Kanäle (z.B. TRPC1, TRPC5, TRPV1 und TRPV6), die wichtigste Klasse von nichtselektiven Kationenkanälen, durch Lanthanide konzentrationsabhängig aktiviert werden (Jung et al. 2003; Bouron et al. 2015). Nichtsdestotrotz wurden nach der (vermuteten) transienten Öffnung dieser TRP-Kanäle die von $\text{TNF}\alpha$ modulierten, Ca^{2+} -permeablen Kanäle geblockt, da die verstärkte Reaktion auf Carbachol in der mit $\text{TNF}\alpha$ inkubierten Gruppe nicht mehr vorhanden war (Tabelle 4, Abbildung 25). Auch die basale zytosolische Ca^{2+} -Konzentration war, zumindest dann, wenn die Inkubationsdauer mit dem Zytokin weniger als 3 d betrug, angehoben. Das war ein Effekt, der in Ca^{2+} -freiem Puffer nicht zu beobachten war (Tabelle 3) und somit die Hypothese unterstützt, dass $\text{TNF}\alpha$ den Einstrom von Ca^{2+} über die Plasmamembran via La^{3+} -sensitive Kationenkanäle stimuliert.

Weniger konsistent waren die Änderungen in der basalen Ca^{2+} -Konzentration bzw. in der Carbachol-induzierten Ca^{2+} -Antwort bei den beiden anderen getesteten proinflammatorischen Zytokinen, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{IFN}\gamma$. Während eine langdauernde Inkubation (5 d) mit $\text{IL-1}\beta$ (Tabelle 5) oder $\text{IFN}\gamma$ (Tabelle 6) die basale Ca^{2+} -Konzentration in Ca^{2+} -haltigem Extrazellulärmedium abfallen ließ, kehrte sich im Falle von $\text{IFN}\gamma$ diese Wirkung um, wenn die Organoide in Ca^{2+} -freiem Puffer inkubiert wurden und damit nur noch die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern Einfluss auf die basale Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol haben sollte. Auch die Veränderungen im Carbachol-induzierten Ca^{2+} -Signal waren relativ inkonsistent: beispielsweise war nach kurzzeitiger (1 d) Inkubation mit $\text{IL-1}\beta$ die Carbachol-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus Speichern signifikant erniedrigt, nach 5 d hingegen signifikant erhöht (Tabelle 5). Eine ähnliche Zeitabhängigkeit ergab sich auch bei der Carbachol-Antwort in Ca^{2+} -haltigem Puffer im Fall von $\text{IFN}\gamma$ (Tabelle 6). Eine verminderte Cl^- -Sekretion nach Inkubation

mit IFN γ zwischen 24 h und 48 h konnte bereits in Studien an T84-Zellen gezeigt werden (Holmgren et al. 1989; Colgan et al. 1994), auch wenn in diesen Experimenten keine Messungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration vorgenommen wurden. Über die Gründe für die veränderte Ca²⁺-Freisetzung kann jedoch nur spekuliert werden. Es könnte an einer Hoch- oder Runterregulation bestimmter TRP-Kanäle (z.B. TRPV1, TRPV4, TRPM8) liegen, welche in verschiedenen Entzündungsmodellen des Darms und bei IBD Patienten gefunden wurde (D'Aldebert et al. 2011; Chen et al. 2020). Eine verminderte Expression von TRP-Kanälen würde auch eine schlechtere Wiederauffüllung der Ca²⁺-Speicher zur Folge haben.

Konsistenter waren die Veränderungen, wenn alle drei proinflammatorischen Zytokine in Kombination verabreicht wurden. Hier war die basale Ca²⁺-Konzentration nach mindestens 3 d Inkubation mit dem Zytokin-Mix deutlich reduziert. Dieser Effekt blieb auch nach Entfernen von Ca²⁺ aus dem Extrazellulärraum bestehen, was auf eine verminderte spontane Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speicherorganellen (wie endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat oder Mitochondrien) schließen lässt. Der Carbachol-induzierte Anstieg des Fura-2-Signals hingegen war signifikant gesteigert: nach 1 d nur zu beobachten in Ca²⁺-haltigem Puffer (was für einen gesteigerten Einstrom aus dem Extrazellulärraum sprechen könnte), während nach 3 und 5 d eine deutliche Steigerung in Ca²⁺-freiem Puffer bestand (Tabelle 7, Abbildung 32 B, D). Dies deutet auf eine vermehrte Freisetzung aus Speichern hin, ähnlich wie es bei Langzeitinkubation (5 d) mit IL-1 β zu messen war (Tabelle 5). Die sehr deutliche Steigerung der Carbachol-Antwort in Ca²⁺-haltigem Puffer durch 1 d Zytokin-Mix-Exposition – der Anstieg des Fura-2-Signals fiel mit $2,46 \pm 0,17$ im Vergleich zu den Kontrollen ($1,62 \pm 0,09$) um $0,82 \pm 0,19$, also gut die Hälfte, größer aus (Abbildung 33) – konnte durch das Blockieren von membranständigen, nichtselektiven Kationenkanälen mit La³⁺ zwar nicht komplett unterdrückt, jedoch signifikant reduziert werden (Abbildung 33). Dies könnte bedeuten, dass auch, wie bei alleiniger Inkubation mit TNF α , durch den Zytokin-Mix membranständige Kationenkanäle moduliert werden. Der schnellere Effekt (vgl. Tabelle 3 und Tabelle 7) könnte womöglich durch die gleichzeitige Stimulation

mit IFN γ und eine damit eventuell einhergehende vermehrte Expression von TNF-Rezeptoren erklärt werden (Wang et al. 2006; Ruggiero et al. 1986).

Für einen mittleren Zeitpunkt (3 d) wurde mittels qPCR untersucht, ob sich die Expression von verschiedenen Rezeptoren, Signalmolekülen oder Iontentransportern verändert, wenn der Zytokin-Mix auf die Organoide einwirkt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da bereits nach 3 Tagen Exposition die basale Ca²⁺-Konzentration in den Organoiden signifikant herunterreguliert war, während die Ca²⁺-Freisetzung aus Speichern nach Stimulation mit Carbachol deutlich erhöht war (Tabelle 7, Abbildung 32 B, D). Zumindest auf mRNA-Ebene ergaben sich keine Hinweise darauf, dass eine Heraufregulation der Expression von muskarinergen Rezeptoren (Typ M₃) oder ihrer nachgeschalteten Signalmoleküle wie der α -Untereinheit des G_q-Proteins oder der Phospholipase C β 3 für die Steigerung der Carbacholantwort verantwortlich sein könnte; im Gegenteil war die Expression dieser Zielstrukturen sogar vermindert (Abbildung 36). Eine reduzierte funktionelle Antwort und Verteilung von M₃-Rezeptoren bei Entzündung wurde bereits in der glatten Muskulatur des Darms von Ratte und Hund beschrieben (Jadcherla 2002; Wells und Blennerhassett 2005). Auch das G_q-Protein α war in caninen glatten Muskelzellen des Darms nach Ileitis in Expression und Aktivität reduziert (Shi und Sarna 2004). Eine verminderte Expression der PLC β 3 konnte in humanen Biopsien von Patienten mit Morbus Crohn festgestellt werden (Ando et al. 2024).

Interessanterweise waren in meinem Projekt IP₃-Rezeptoren vom Typ IP₃R1, die für die Ca²⁺-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum verantwortlich sind, sowie STIM-Moleküle (STIM1 nur im Trend, STIM2 signifikant), die die Ca²⁺-Konzentration innerhalb des endoplasmatischen Retikulums registrieren (Brandman et al. 2007; Onodera et al. 2013), signifikant heraufreguliert (Abbildung 35). Möglicherweise könnte dies der Ursprung der beobachteten verstärkten Ca²⁺-Antwort auf die Carbacholstimulation sein. Obwohl Daten zur Erfassung der Expression auf Proteinebene (z.B. Western-Blot) bzw. ihrer korrekten Lokalisation (Immunhistochemie) fehlen, geben diese Daten dennoch einen Hinweis auf die

möglichen Mechanismen, über welche proinflammatorische Zytokine durch die Wirkung auf intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher mit Ca^{2+} -Signalwegen im Darmepithel interferieren.

Dass nach mehrtägiger Zytokinexposition (3 d Inkubation mit dem Zytokin-Mix) die Wirkung der proinflammatorischen Zytokine sich vor allem an der Ca^{2+} -Freisetzung aus Speichern abspielt, zeigen auch die Ca^{2+} -Depletions/Repletionsversuche (Abbildung 34). Bei diesem Versuchsprotokoll wird in Ca^{2+} -freiem Medium die Aktivität der sarcoendoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA) durch Thapsigargin blockiert (Takemura et al. 1989). Dies führt zu einer allmählichen Speicherentleerung. Die geringe Konzentration an Ca^{2+} in dem wichtigsten Ca^{2+} -Speicher der Zelle, dem ER, löst eine Konformationsänderung in STIM aus, welche normalerweise einen Einstrom von Ca^{2+} durch membranständige ORAI-Kanäle aktiviert sowie die Aktivität von TRP-Kanälen positiv beeinflusst (Shen et al. 2011). Dieser Vorgang des kapazitiven Ca^{2+} Einstroms, welcher auch als Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE; Abbildung 7) bezeichnet wird, kann erst dann bei diesem Protokoll stattfinden, wenn im Extrazellulärraum wieder Calciumionen vorhanden sind. Der darauffolgende Anstieg im Fura-2 Ratio-Signal ist also ein direktes Maß für den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom.

Dieser kapazitative Ca^{2+} -Einstrom war numerisch nach 1 d Zytokinbehandlung herauf- und nach 3 d oder 5 d numerisch herunterreguliert (Tabelle 9). Auch wenn die Unterschiede zwischen den mit dem Zytokin-Mix behandelten und den unbehandelten Kontrollorganoiden aufgrund der starken Streuung der Daten keine statistische Signifikanz erreichten, war es doch auffällig, dass der kapazitative Ca^{2+} -Einstrom genau entgegengesetzt reguliert wurde im Vergleich zur Carbachol-Antwort unter Ca^{2+} -freien Bedingungen, welche auf die Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern zurückgeht (signifikant reduziert nach 1 d Zytokin-Mix; signifikant erhöht nach 3 und 5 d Zytokin-Mix; Tabelle 7, Abbildung 32 B, D). Dies ist besonders dahingehend überraschend, da die qPCR Messungen zeigten, dass die für den kapazitiven Einstrom von Ca^{2+} maßgeblich verantwortlichen Strukturen, insbesondere STIM2, verstärkt exprimiert wurden (Abbildung 35). Es muss also an anderer Stelle noch eine weitere

Regulation stattfinden. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte sein, dass bei vielen Zelltypen neben den Proteinen STIM und ORAI auch verschiedene TRP-Kanäle als Bestandteil des Komplexes, welcher den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom über die Zellmembran vermittelt, diskutiert werden, bzw. spekuliert wird, dass TRP-Kanäle nach ORAI/STIM-Aktivierung geöffnet werden und so den Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran verstärken (Salido et al. 2011; Hooper et al. 2013). Möglicherweise werden die am kapazitiven- Ca^{2+} -Einstrom beteiligten TRP-Kanäle durch den Zytokin-Mix so stark reduziert, dass es trotz erhöhter Expression von STIM zu einem reduzierten Einstrom kommt. Dass die Expression von TRP-Kanälen durch IBD (D'Aldebert et al. 2011; Chen et al. 2020) und Zytokine (Radhakrishnan et al. 2013) moduliert wird, wurde bereits mehrfach gezeigt. Eine Zytokinkombination aus $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ and $\text{IL-1}\beta$ reduzierte in Versuchen mit Nierenzellen der Maus (mIMCD3) die Expression des TRPV5 Kanals (Radhakrishnan et al. 2013). Alternativ könnten auch Effekte auf insbesondere zytosolische Ca^{2+} -Puffer wie Calbindin oder Mitochondrien die Depletions-/Repletionsversuche beeinflusst haben (Schwaller 2010). Es bedarf daher weiterer Untersuchungen, um die genaue Ursache für die durch die Zytokine modulierte Ca^{2+} -Homöostase zu identifizieren. Abbildung 37 fasst die Befunde zur Wirkung proinflammatorischer Zytokine auf Ca^{2+} -Signalwege zusammen.

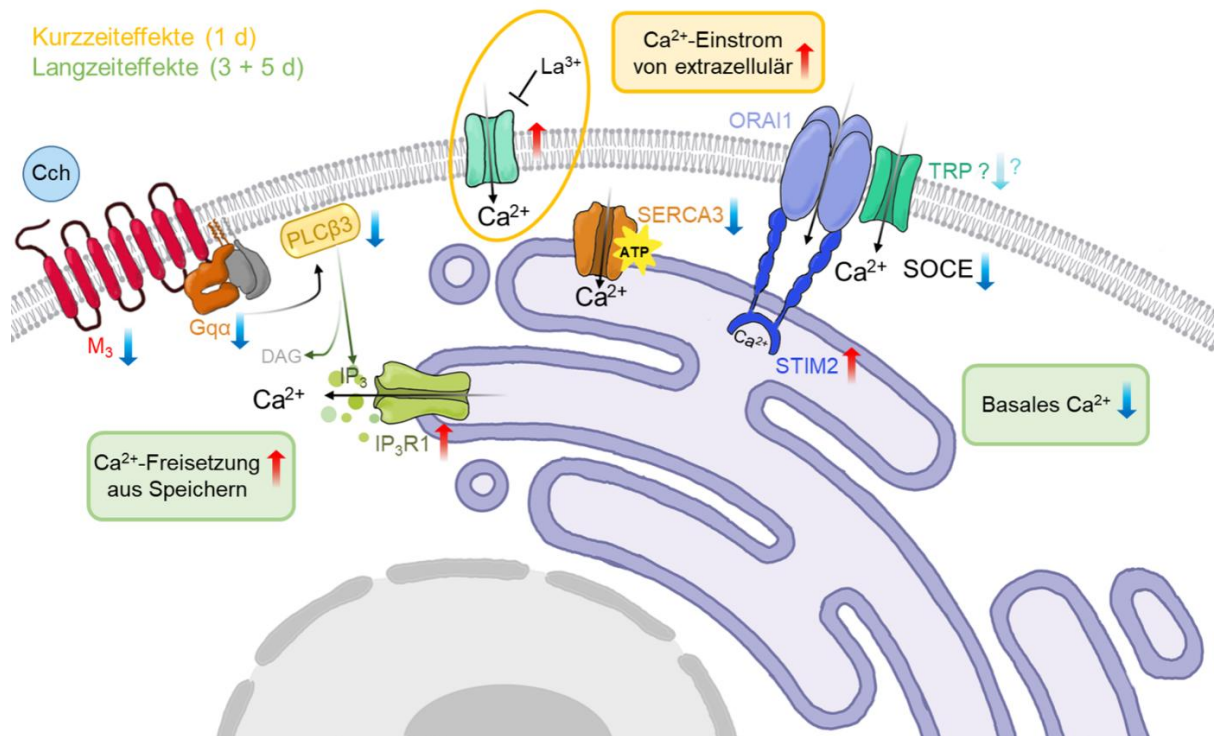


Abbildung 37: Modulation der Ca^{2+} -Homöostase durch den Zytokin-Mix

Diese Abbildung zeigt die wichtigsten Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase durch die Wirkung des Zytokin-Mix. Signifikante Veränderungen sind mit einem Pfeil in rot oder blau gekennzeichnet. Kurzzeiteffekte auf die Ca^{2+} -Homöostase nach einer Inkubationszeit von 1 d sind mit gelb umrandet/hinterlegt, Langzeiteffekte (3 d und 5 d Inkubation) mit grün.

7.6 Limitationen des intestinalen Organoidmodells

Das Organoidmodell – so sinnvoll es im Sinne des 3R-Gedankens als Ergänzung des Versuchsrepertoires zur Erforschung inflammatorischer Prozesse am Darm ist – hat aber auch Einschränkungen im Vergleich zu In-vivo-Untersuchungen oder Ex-vivo-Experimenten an Darmpräparaten von Tieren z.B. mit einer experimentell erzeugten Kolitis. Das Fehlen von u.a. Neuronen, Drüsen, Bindegewebe, Muskel- und Immunzellen ist in der Einordnung der Ergebnisse nicht zu vernachlässigen. So produzieren z.B. Myofibroblasten Eicosanoide wie etwa PGE₂ (Shao et al. 2006) oder prosekretorische Neurone aus dem Plexus submucosus setzen Transmitter frei (Cooke 2000), die eine spontane Cl⁻-Sekretion auslösen (Andres et al. 1985) indem sie z.B. für eine spontane Aktivität des CFTR Cl⁻-Kanals in der apikalen Membran sorgen. Auch die Interaktion mit Immunzellen wie Makrophagen, Lymphozyten oder Mastzellen, die sich physiologischerweise in der Darmwand befinden (Cader und Kaser 2013), fehlt in diesem Modell (Abbildung 38). Abhilfe könnten hier gezielte Cokulturexperimente schaffen, in denen jeweils einer oder mehrere dieser Zelltypen gemeinsam mit den Organoiden kultiviert werden.

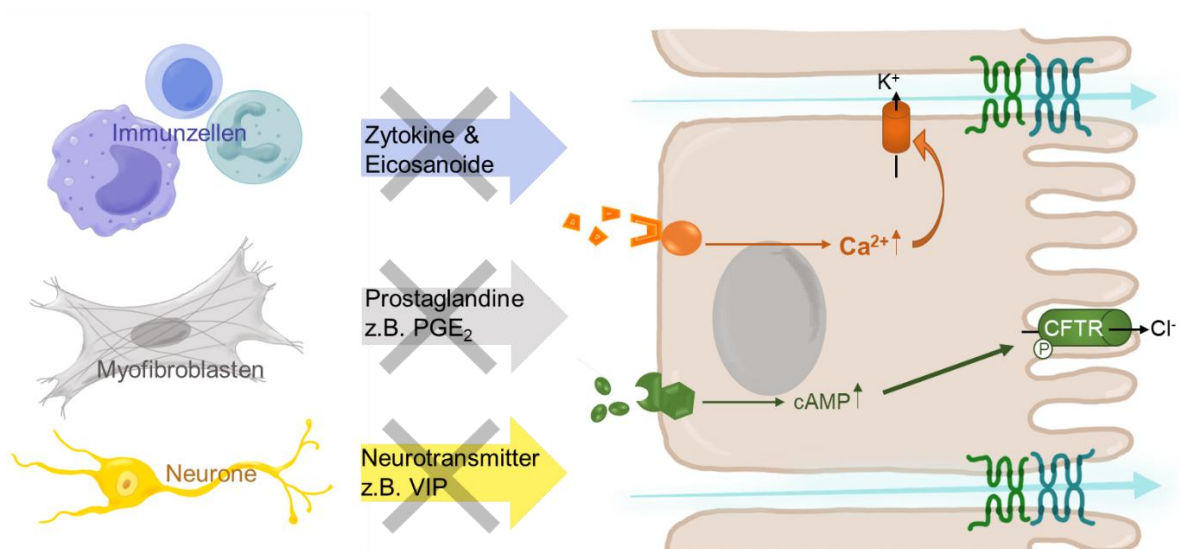


Abbildung 38: Limitierungen des Organoidmodells

VIP = Vasoaktives intestinales Peptid

Neben einer veränderten Sekretion spielt auch eine Reduktion der Resorption in IBD eine wichtige Rolle (Priyamvada et al. 2015). In dem aktuellen Organoidmodell ist eine funktionelle Messung der Resorption jedoch sehr schwierig. Das „Umdrehen“ der Organoide in einem sogenannten Apical-out-Modell (Co et al. 2021; Kakni et al. 2023), bei welchem die apikale Seite der Epithelzellen nach außen und die basale Seite ins Innere der Organoide gerichtet ist, könnte dies jedoch ermöglichen, da dadurch ein direkter Zugang zur apikalen Seite der Epithelzellen möglich ist. Über die apikale Membran der Darmepithelzellen findet *in vivo* auch die Interaktion mit dem darmeigenem Mikrobiom statt, welches u.a. durch Produktion kurzkettiger Fettsäuren wichtige Energieträger für das Darmepithel (und das ganze Tier) liefert und durch seine Interaktion mit dem darmeigenen Immunsystem viele immunologische Prozesse im gesamten Organismus beeinflusst (Goyal et al. 2021). Die Komplexität dieser Interaktion fehlt in meinem Organoidmodell und lässt sich selbst mit Cokulturen nicht vollständig simulieren (Kim et al. 2022).

Auf der anderen Seite bietet diese Limitierung aber auch Vorteile. Durch das Fehlen anderer Zelltypen und der Wirkung des doch sehr diversen Mikrobioms lassen sich gezielt (Langzeit-)Effekte auf das Darmepithel untersuchen und so beispielsweise Widersprüche in der Literatur – wie etwa die Beobachtung, dass prosekretorische Zytokine die Ca^{2+} -abhängige intestinale Sekretion *ex vivo* hemmen (Pérez-Navarro et al. 2005) und an Kolontumorzelllinien dagegen steigern (Oprins et al. 2000) – aufklären. Die verschiedenen Quellen für Stammzellen (wie z.B. humane Biopsien, induzierte pluripotente Stammzellen, murine Darmsegmente) eröffnen viele Möglichkeiten, erschweren aber gleichzeitig die Vergleichbarkeit der Organoidmodelle. Das Problem der Vergleichbarkeit findet sich jedoch in allen Modellen, ob *In-vivo*-Tierversuche oder Zellkulturen. Nichtsdestotrotz sind Organoide ein vielversprechendes Modell und ihr Einsatz ermöglicht eine deutliche Reduktion der Versuchstierzahlen, auch wenn Organoide aktuell noch kein vollständiger Ersatz für Tierversuche sind.

7.7 Ausblick auf zukünftige Projekte

Das hier vorgestellte Projekt zur Untersuchung proinflammatorischer Zytokine an intestinalen Organoiden bietet eine Reihe von Möglichkeiten, die Wirkung von Botenstoffen des Immunsystems am Darmepithel tiefergehend zu untersuchen. Aktuell werden von mir in Kooperation mit dem Institut für Analytische Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen Lipidomics und Proteomics Messungen der mit TNF α und dem Zytokin-Mix behandelten Organoiden durchgeführt, um herauszufinden, wie und wo sich die Lipidzusammensetzung in den Organoiden oder die Expression von Proteinen nach Einwirkung unterschiedlicher Zytokine verändert. Abbildung 39 zeigt beispielhaft die Heraufregulation (um mehr als 300 % im Vergleich zu Kontrollorganoiden) und die Verteilung von Phosphatidylcholin und Ceramid in mit TNF α inkubierten Organoiden. Ceramide sind wichtige Marker für Apoptosevorgänge (Haimovitz-Friedman et al. 1997), während Phosphatidylcholin für seine protektiven Effekte u.a. als Teil der Mucus-Barriere bekannt ist (Braun et al. 2009; van der Veen et al. 2017).

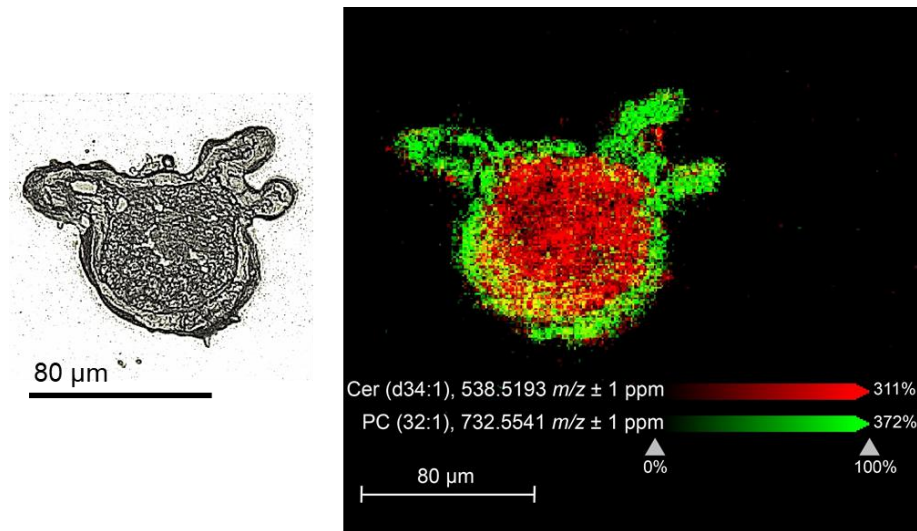


Abbildung 39: Mass spectrometry imaging (MSI) Aufnahme

Repräsentative Aufnahme der Verteilung eines Phosphatidylcholins (PC 32:1; grün) und eines Ceramids (Cer d34:1; rot) in mit TNF α inkubierten Organoid (100 ng/ml, 3 d), gemessen mit ultra-high lateral resolution AP-SMALDI MSI; Auflösung = 1,5 μ m. Die Farbskalierung gibt die Hochregulation gegenüber unbehandelten Kontrollorganoiden wieder (= 100 %). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Parviz Ghezellou (Institut für Analytische Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen).

Die „ungezielte“ Messung („untargeted approach“) von Änderungen in der Protein- und Lipidzusammensetzung der Epithelzellen, bei denen jeweils mehrere tausend verschiedene Molekülarten in den Proben mit hoher Ortsauflösung detektiert werden können, bietet möglicherweise die Chance, bislang unbekannte Effekte von Zytokinen am Darmepithel zu entdecken.

8. Zusammenfassung

Inflammatory bowel disease (IBD) ist eine multifaktorielle Erkrankung mit bislang nicht vollständig geklärter Pathogenese. Um die Effekte der proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{IFN}\gamma$, welche in Blut und Gewebeproben von IBD-Patienten deutlich erhöht sind, auf das Darmepithel zu untersuchen, wurden murine Dünndarmorganoide als Modell gewählt. Histologische, immunfluoreszenzmikroskopische und funktionelle Kontrollen (Schwellung durch Sekretagoge) bestätigten die Integrität der erhaltenen Organoide.

Die Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$ alleine oder mit einem Zytokin-Mix aus $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{IFN}\gamma$ führte zu einer Schwellung der Organoide, welche mit einer erhöhten Menge an abgestorbenen Zellmaterial im Organoidlumen einherging. Die Immunfluoreszenzfärbungen gegen aktivierte Caspase 3 zeigten eine vermehrte Apoptose nach Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$. Entgegen der initialen Vermutung, dass es in Gegenwart proinflammatorischer Zytokine zu einer verminderten Expression von abdichtenden Komponenten der Tight Junctions kommt, wurde in qPCR-Versuchen eine erhöhte Expression der abdichtenden Claudinen 3 und 4 nach 3 d Inkubation mit dem Zytokin-Mix gemessen.

Die qPCR-Messungen zeigten eine signifikant erhöhte Expression des Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Cotransporters NKCC1 nach $\text{TNF}\alpha$ -Inkubation. Blockade des NKCC1 mit Bumetanid reduzierte die durch die Zytokine induzierte Schwellung signifikant. Indometacin, ein Hemmer von Cyclooxygenasen und damit der Produktion von Prostaglandinen, hatte keinen Einfluss auf die Zytokin-induzierte Schwellung.

In Ca^{2+} -Imaging Versuchen, in denen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 aufgeladene Organoide mit dem Acetylcholinderivat Carbachol stimuliert wurden, hatten die Zytokine $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{IFN}\gamma$ einzeln und als Zytokin-Mix sehr unterschiedliche Effekte, die zudem eine deutliche Zeitabhängigkeit aufwiesen. $\text{TNF}\alpha$ steigerte die Antwort auf Carbachol, ein Effekt, der nach 3 d am deutlichsten nachweisbar war. Diese stimulierende Wirkung war von der Anwesenheit von Ca^{2+} im

Extrazellulärraum abhängig und wurde durch La^{3+} , einen Blocker von Ca^{2+} -permeablen Kationenkanälen in der Plasmamembran, gehemmt. Dies zeigt, dass $\text{TNF}\alpha$ vor allem den Ca^{2+} -Einstrom von außen in die Epithelzellen stimuliert.

Komplexer waren die Veränderungen im Ca^{2+} -Signaling bei Exposition der Organoide mit den drei Zytokinen, wenn sie in Kombination appliziert wurden. Die basale Ca^{2+} -Konzentration war nach längerer (≥ 3 d) Zytokinexposition erniedrigt. Da dies auch in Ca^{2+} -freiem extrazellulärem Medium beobachtet wurde, deutet dies auf eine verminderte basale Ca^{2+} -Freisetzung aus zellulären Speichern hin. Die Antwort auf Carbachol hingegen war mit Ausnahme eines Messpunktes (1 d Zytokinmix in Ca^{2+} -freiem Medium) gesteigert. Die stimulierende Wirkung des Zytokinmixes auf die Carbacholantwort wurde zu mehr als 80 % durch La^{3+} reduziert und war verbunden mit einer (numerischen) Erhöhung des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms in Ca^{2+} -Depletions-/Repletionsexperimenten.

qPCR-Messungen ergaben, dass es in Gegenwart des Zytokinmixes paradoxerweise zu einer signifikanten Herunterregulation der Expression mehrerer Komponenten der cholinergen Signaltransduktion wie dem Muskarinrezeptor vom Typ M_3 , der α -Untereinheit von G_q -Proteinen und der Phospholipase $\text{C}\beta 3$ kommt. Die Verstärkung des Ca^{2+} -Signals durch Zytokine kann also nicht durch Änderung auf Rezeptorebene oder den direkt nachgeschalteten Signalwegen zurückgehen, sondern muss sich weiter distal abspielen. Kandidaten dafür könnten Bestandteile der Kommunikation zwischen intrazellulären Speichern und der Plasmamembran sein wie dem IP_3 -Rezeptor Typ 1 und dem Protein STIM2 , deren Expression durch den Zytokin-Mix signifikant heraufreguliert wurde.

Die Ergebnisse dieses Projekts zeigen, dass sich Organoide, trotz ihrer Einschränkungen, wie z.B. das Fehlen von mit dem Darmepithel in vivo interagierenden Zellen, wie etwa Immunzellen, enterischen Neuronen oder Fibroblasten, als Modell für entzündliche Darmerkrankungen eignen, um insbesondere die Langzeiteffekte von Zytokinen auf Epithelzellen zu untersuchen.

9. Summary

Inflammatory bowel disease (IBD) is a multifactorial disease with a pathogenesis that is not yet fully understood. To investigate the effects of the proinflammatory cytokines TNF α , IL-1 β and IFN γ , which are significantly elevated in blood and tissue samples from IBD patients, on the intestinal epithelium, murine small intestinal organoids were chosen as a model. Histologic, immunofluorescence microscopy and functional controls (swelling induced by secretagogues) confirmed the integrity of the organoids obtained.

Incubation with TNF α alone or with a cytokine mix of TNF α , IL-1 β and IFN γ led to swelling of the organoids, which was accompanied by an increased amount of dead cell material in the organoid lumen. Immunofluorescence staining against activated caspase 3 showed increased apoptosis after incubation with TNF α . Contrary to the initial assumption that in the presence of proinflammatory cytokines there is a decreased expression of sealing components of the tight junctions, qPCR experiments revealed an increased expression of the sealing claudins 3 and 4 after 3 d incubation with the cytokine mix.

The qPCR measurements showed a significantly increased expression of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransporter NKCC1 after TNF α incubation. Blocking of NKCC1 with bumetanide significantly reduced cytokine-induced swelling. Indomethacin, an inhibitor of cyclooxygenases and thus of prostaglandin production, had no effect on cytokine-induced swelling.

In Ca²⁺-imaging experiments, in which organoids loaded with the fluorescent dye fura-2 were stimulated with the acetylcholine derivative carbachol, the cytokines TNF α , IL-1 β and IFN γ had very different effects individually and as a cytokine mix, which also showed a clear time dependency. TNF α increased the response to carbachol, an effect that was most clearly detectable after 3 d. This stimulatory effect was dependent on the presence of Ca²⁺ in the extracellular space and was inhibited by La³⁺, a blocker of Ca²⁺-permeable cation channels in the plasma membrane, demonstrating that TNF α primarily stimulates Ca²⁺-influx into epithelial cells from extracellular.

The changes in Ca^{2+} -signaling were more complex when the organoids were exposed to the three cytokines in combination. The basal Ca^{2+} concentration was decreased after prolonged (≥ 3 d) cytokine exposure. Since this was also observed in Ca^{2+} -free extracellular medium, this indicates a reduced basal Ca^{2+} release from cellular stores. In contrast, the response to carbachol was increased with the exception of one measurement point (1 d cytokine-mix in Ca^{2+} -free medium). The stimulatory effect of the cytokine-mix on the carbachol response was reduced by more than 80 % by La^{3+} and was associated with a (numerical) increase in the capacitative Ca^{2+} influx in Ca^{2+} -depletion/repletion experiments.

qPCR measurements revealed that, paradoxically, in the presence of the cytokine-mix, there is a significant downregulation of the expression of several components of the cholinergic signal transduction such as the muscarinic receptor type M_3 , the α subunit of G_q proteins and the phospholipase $\text{C}\beta 3$. Thus, the amplification of Ca^{2+} -signaling by cytokines cannot be due to changes at the receptor level or the immediate downstream signaling pathways, but must occur at a later point. Candidates for this could be components of the communication between intracellular stores and the plasma membrane such as the IP_3 -receptor type 1 and the protein STIM2 , whose expression was significantly upregulated by the cytokine-mix.

The results of this project show that organoids, despite their limitations due to the lack of cells interacting with the intestinal epithelium *in vivo* i.e. immune cells, enteric neurons or fibroblasts, are a viable model for inflammatory bowel disease, in particular to study the long-term effects of cytokines on epithelial cells.

10. Verzeichnisse

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Risiken und Symptome von IBD	- 6 -
Abbildung 2: Epithelbarriere im Darm	- 9 -
Abbildung 3: Organoide	- 11 -
Abbildung 4: Signalwege der Zytokine	- 15 -
Abbildung 5: Erhöhung der parazellulären Permeabilität.....	- 17 -
Abbildung 6: Chloridsekretion am Darmepithel.....	- 21 -
Abbildung 7: Ca ²⁺ - Signaling.....	- 23 -
Abbildung 8: 24-Well Platte mit Matrigeltropfen.....	- 31 -
Abbildung 9: Fluoreszenzfarbstoff Fura-2.....	- 35 -
Abbildung 10: Setup für Live-Cell-Imaging Versuche.....	- 36 -
Abbildung 11: Rotation der Gelatineblöckchen.....	- 39 -
Abbildung 12: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz.....	- 40 -
Abbildung 13: Prinzip der TaqMan RT-qPCR	- 45 -
Abbildung 14: Bestimmung der Relativen Lumengröße	- 52 -
Abbildung 15: HE- und PAS-Färbung	- 54 -
Abbildung 16: Immunfluoreszenz Organoide.....	- 56 -
Abbildung 17: Schwellungsversuche	- 58 -
Abbildung 18: Organoide vor und 24 h nach TNF α	- 60 -
Abbildung 19: Caspase-3 positive Zellen	- 62 -
Abbildung 20: TNF α -induzierte Schwellung über 22 h.....	- 64 -
Abbildung 21: qPCR TNF α	- 65 -

Verzeichnisse

Abbildung 22: Immunfluoreszenz NKCC1.....	- 67 -
Abbildung 23: Bumetanid reduziert die TNF α -induzierte Schwellung.....	- 69 -
Abbildung 24: Repräsentative Kurven von Ca ²⁺ -Imaging-Experimenten.....	- 71 -
Abbildung 25: Ca-Imaging-Experimente mit Lanthan.....	- 75 -
Abbildung 26: Hochdosierte IFN γ	- 78 -
Abbildung 27: Organoide 24 h nach Inkubation mit dem Zytokin-Mix.....	- 82 -
Abbildung 28: Durch den Zytokin-Mix induzierte Schwellung über 22 h.....	- 83 -
Abbildung 29: Bumetanid reduziert die Zytokin-Mix induzierte Schwellung.....	- 84 -
Abbildung 30: qPCR NKCC1 & CFTR.....	- 85 -
Abbildung 31: qPCR Claudine.....	- 86 -
Abbildung 32: Modulation der Ca ²⁺ -Antwort auf Carbachol durch den Zytokin-Mix.....	- 89 -
Abbildung 33: Anstieg der Ca ²⁺ -Antwort durch den Zytokin-Mix.....	- 91 -
Abbildung 34: Ca ²⁺ -Depletion/Repletion mit Thapsigargin.....	- 92 -
Abbildung 35: qPCR Ca ²⁺ -Speicher.....	- 94 -
Abbildung 36: qPCR M ₃ -Rezeptor und Signalkaskade.....	- 95 -
Abbildung 37: Modulation der Ca ²⁺ -Homöostase durch den Zytokin-Mix.....	- 110 -
Abbildung 38: Limitierungen des Organoidmodells.....	- 111 -
Abbildung 39: Mass spectrometry imaging (MSI) Aufnahme.....	- 114 -

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper für die Immunfluoreszenz.....	- 42 -
Tabelle 2: Primer für die qPCR.....	- 48 -
Tabelle 3: Ca ²⁺ -Imaging TNF α	- 73 -
Tabelle 4: Ca ²⁺ -Imaging mit La ³⁺ -Vorbehandlung (TNF α).....	- 75 -
Tabelle 5: Ca ²⁺ -Imaging IL-1 β	- 77 -
Tabelle 6: Ca ²⁺ -Imaging IFN γ	- 80 -
Tabelle 7: Ca ²⁺ -Imaging Zytokin-Mix	- 88 -
Tabelle 8: Ca ²⁺ -Imaging mit La ³⁺ -Vorbehandlung (Zytokin-Mix).....	- 90 -
Tabelle 9: Ca ²⁺ -Depletion/Repletionsversuche	- 93 -

10.3 Literaturverzeichnis

Ait-Ali, D.; Turquier, V.; Tanguy, Y.; Thouënon, E.; Ghzili, H.; Mounien, L.; Derambure, C.; Jégou, S.; Salier, J.-P.; Vaudry, H. et al. (2008): Tumor necrosis factor (TNF)-alpha persistently activates nuclear factor-kappaB signaling through the type 2 TNF receptor in chromaffin cells: implications for long-term regulation of neuropeptide gene expression in inflammation. In: *Endocrinology* 149 (6), S. 2840–2852. DOI: 10.1210/en.2007-1192.

Aldhous, M. C.; Shmakov, A. N.; Bode, J.; Ghosh, S. (2001): Characterization of conditions for the primary culture of human small intestinal epithelial cells. In: *Clinical and experimental immunology* 125 (1), S. 32–40. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2001.01522.x.

Almeqdadi, M.; Mana, M. D.; Roper, J.; Yilmaz, Ö. H. (2019): Gut organoids: mini-tissues in culture to study intestinal physiology and disease. In: *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 317 (3), C405-C419. DOI: 10.1152/ajpcell.00300.2017.

Al-Sadi, R.; Guo, S.; Ye, D.; Ma, T. Y. (2013): TNF- α modulation of intestinal epithelial tight junction barrier is regulated by ERK1/2 activation of Elk-1. In: *The American Journal of Pathology* 183 (6), S. 1871–1884. DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.09.001.

Ando, T.; Takazawa, I.; Spencer, Z. T.; Ito, R.; Tomimori, Y.; Mikulski, Z.; Matsumoto, K.; Ishitani, T.; Denson, L. A.; Kawakami, Y. et al. (2024): Ileal crohn's disease exhibits reduced activity of phospholipase C- β 3-dependent Wnt/ β -catenin signaling pathway. In: *Cells* 13 (11). DOI: 10.3390/cells13110986.

Andres, H.; Rock, R.; Bridges, R. J.; Rummel, W.; Schreiner, J. (1985): Submucosal plexus and electrolyte transport across rat colonic mucosa. In: *The Journal of physiology* 364, S. 301–312. DOI: 10.1113/jphysiol.1985.sp015746.

Ballout, J.; Diener, M. (2019): Interactions between rat submucosal neurons and mast cells are modified by cytokines and neurotransmitters. In: *European journal of pharmacology* 864, S. 172713. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.172713.

- Barmeyer, C.; Amasheh, S.; Tavalali, S.; Mankertz, J.; Zeitz, M.; Fromm, M.; Schulzke, J.-D. (2004): IL-1beta and TNFalpha regulate sodium absorption in rat distal colon. In: *Biochemical and biophysical research communications* 317 (2), S. 500–507. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.03.072.
- Barreto E Barreto, L.; Rattes, I. C.; da Costa, A. V.; Gama, P. (2022): Paneth cells and their multiple functions. In: *Cell biology international* 46 (5), S. 701–710. DOI: 10.1002/cbin.11764.
- Barrett, K. E.; Keely, S. J. (2000): Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. In: *Annual review of physiology* 62, S. 535–572. DOI: 10.1146/annurev.physiol.62.1.535.
- Bauer, C.; Duewell, P.; Mayer, C.; Lehr, H. A.; Fitzgerald, K. A.; Dauer, M.; Tschopp, J.; Endres, S.; Latz, E.; Schnurr, M. (2010): Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. In: *Gut* 59 (9), S. 1192–1199. DOI: 10.1136/gut.2009.197822.
- Becker, J.; Ott, D.; Diener, M. (2019): Impact of sensitization and inflammation on the interaction of mast cells with the intestinal epithelium in rats. In: *Frontiers in physiology* 10, S. 329. DOI: 10.3389/fphys.2019.00329.
- Beltinger, J.; McKaig, B. C.; Makh, S.; Stack, W. A.; Hawkey, C. J.; Mahida, Y. R. (1999): Human colonic subepithelial myofibroblasts modulate transepithelial resistance and secretory response. In: *The American journal of physiology* 277 (2), C271-9. DOI: 10.1152/ajpcell.1999.277.2.C271.
- Berridge, M. J. (1997): Elementary and global aspects of calcium signalling. In: *The Journal of physiology* 499 (Pt 2) (Pt 2), S. 291–306. DOI: 10.1113/jphysiol.1997.sp021927.
- Bischof, G.; Brenman, J.; Bredt, D. S.; Machen, T. E. (1995): Possible regulation of capacitative Ca²⁺ entry into colonic epithelial cells by NO and cGMP. In: *Cell calcium* 17 (4), S. 250–262. DOI: 10.1016/0143-4160(95)90071-3.

- Bode, H.; Schmitz, H.; Fromm, M.; Scholz, P.; Riecken, E. O.; Schulzke, J. D. (1998): IL-1beta and TNF-alpha, but not IFN-alpha, IFN-gamma, IL-6 or IL-8, are secretory mediators in human distal colon. In: *Cytokine* 10 (6), S. 457–465. DOI: 10.1006/cyto.1997.0307.
- Böhme, M.; Diener, M.; Rummel, W. (1991): Calcium- and cyclic-AMP-mediated secretory responses in isolated colonic crypts. In: *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 419 (2), S. 144–151. DOI: 10.1007/BF00373000.
- Bottero, V.; Imbert, V.; Frelin, C.; Formento, J.-L.; Peyron, J.-F. (2003): Monitoring NF-kappa B transactivation potential via real-time PCR quantification of I kappa B-alpha gene expression. In: *Molecular diagnosis: a journal devoted to the understanding of human disease through the clinical application of molecular biology* 7 (3-4), S. 187–194. DOI: 10.1007/BF03260037.
- Bouron, A.; Kiselyov, K.; Oberwinkler, J. (2015): Permeation, regulation and control of expression of TRP channels by trace metal ions. In: *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 467 (6), S. 1143–1164. DOI: 10.1007/s00424-014-1590-3.
- Boyapati, R. K.; Rossi, A. G.; Satsangi, J.; Ho, G.-T. (2016): Gut mucosal DAMPs in IBD: from mechanisms to therapeutic implications. In: *Mucosal immunology* 9 (3), S. 567–582. DOI: 10.1038/mi.2016.14.
- Bradford, E. M.; Ryu, S. H.; Singh, A. P.; Lee, G.; Goretsky, T.; Sinh, P.; Williams, D. B.; Cloud, A. L.; Gounaris, E.; Patel, V. et al. (2017): Epithelial TNF receptor signaling promotes mucosal repair in inflammatory bowel disease. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 199 (5), S. 1886–1897. DOI: 10.4049/jimmunol.1601066.
- Brandman, O.; Liou, J.; Park, W. S.; Meyer, T. (2007): STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. In: *Cell* 131 (7), S. 1327–1339. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.039.

Braun, A.; Treede, I.; Gotthardt, D.; Tietje, A.; Zahn, A.; Ruhwald, R.; Schoenfeld, U.; Welsch, T.; Kienle, P.; Erben, G. et al. (2009): Alterations of phospholipid concentration and species composition of the intestinal mucus barrier in ulcerative colitis: a clue to pathogenesis. In: *Inflammatory bowel diseases* 15 (11), S. 1705–1720. DOI: 10.1002/ibd.20993.

Buschmann, M. M.; Le Shen; Rajapakse, H.; Raleigh, D. R.; Wang, Y.; Wang, Y.; Lingaraju, A.; Zha, J.; Abbott, E.; McAuley, E. M. et al. (2013): Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux. In: *Molecular biology of the cell* 24 (19), S. 3056–3068. DOI: 10.1091/mbc.E12-09-0688.

Butcher, M. J.; Zhu, J. (2021): Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice. In: *Faculty reviews* 10, S. 30. DOI: 10.12703/r/10-30.

Cader, M. Z.; Kaser, A. (2013): Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. In: *Gut* 62 (11), S. 1653–1664. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303955.

Cameron, H. L.; Perdue, M. H. (2007): Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. In: *Neurogastroenterology and motility* 19 (1), S. 47–56. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2006.00845.x.

Capaldo, C. T. (2023): Claudin barriers on the brink: How conflicting tissue and cellular priorities drive IBD pathogenesis. In: *International journal of molecular sciences* 24 (10). DOI: 10.3390/ijms24108562.

Caughey, G. E.; Cleland, L. G.; Penglis, P. S.; Gamble, J. R.; James, M. J. (2001): Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167 (5), S. 2831–2838. DOI: 10.4049/jimmunol.167.5.2831.

Chan, J. K. C. (2014): The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. In: *International journal of surgical pathology* 22 (1), S. 12–32. DOI: 10.1177/1066896913517939.

Chen, Y.; Mu, J.; Zhu, M.; Mukherjee, A.; Zhang, H. (2020): Transient receptor potential channels and inflammatory bowel disease. In: *Frontiers in immunology* 11, S. 180. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00180.

Citi, S.; Fromm, M.; Furuse, M.; González-Mariscal, L.; Nusrat, A.; Tsukita, S.; Turner, J. R. (2024): A short guide to the tight junction. In: *Journal of cell science* 137 (9). DOI: 10.1242/jcs.261776.

Clapham, D. E. (2007): Calcium signaling. In: *Cell* 131 (6), S. 1047–1058. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.028.

Co, J. Y.; Margalef-Català, M.; Monack, D. M.; Amieva, M. R. (2021): Controlling the polarity of human gastrointestinal organoids to investigate epithelial biology and infectious diseases. In: *Nature protocols* 16 (11), S. 5171–5192. DOI: 10.1038/s41596-021-00607-0.

Colgan, S. P.; Parkos, C. A.; Matthews, J. B.; D’Andrea, L.; Awtrey, C. S.; Lichtman, A. H.; Delp-Archer, C.; Madara, J. L. (1994): Interferon-gamma induces a cell surface phenotype switch on T84 intestinal epithelial cells. In: *The American journal of physiology* 267 (2 Pt 1), C402-10. DOI: 10.1152/ajpcell.1994.267.2.C402.

Cooke, H. J. (2000): Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 915, S. 77–80. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05225.x.

Craven, P. A.; DeRubertis, F. R. (1986): Profiles of eicosanoid production by superficial and proliferative colonic epithelial cells and sub-epithelial colonic tissue. In: *Prostaglandins* 32 (3), S. 387–399. DOI: 10.1016/0090-6980(86)90007-9.

D'Aldebert, E.; Cenac, N.; Rousset, P.; Martin, L.; Rolland, C.; Chapman, K.; Selves, J.; Alric, L.; Vinel, J.-P.; Vergnolle, N. (2011): Transient receptor potential vanilloid 4 activated inflammatory signals by intestinal epithelial cells and colitis in mice. In: *Gastroenterology* 140 (1), S. 275–285. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.09.045.

Dharmasathaphorn, K.; Pandol, S. J. (1986): Mechanism of chloride secretion induced by carbachol in a colonic epithelial cell line. In: *J Clin Invest* 77 (2), S. 348–354. DOI: 10.1172/JCI112311.

Dhawan, P.; Ahmad, R.; Chaturvedi, R.; Smith, J. J.; Midha, R.; Mittal, M. K.; Krishnan, M.; Chen, X.; Eschrich, S.; Yeatman, T. J. et al. (2011): Claudin-2 expression increases tumorigenicity of colon cancer cells: role of epidermal growth factor receptor activation. In: *Oncogene* 30 (29), S. 3234–3247. DOI: 10.1038/onc.2011.43.

Dinarello, C. A. (1996): Biologic basis for interleukin-1 in disease. In: *Blood* 87 (6), S. 2095–2147.

Du, Y.; Gao, H.; He, C.; Xin, S.; Wang, B.; Zhang, S.; Gong, F.; Yu, X.; Pan, L.; Sun, F. et al. (2023): An update on the biological characteristics and functions of tuft cells in the gut. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 10, S. 1102978. DOI: 10.3389/fcell.2022.1102978.

Dymond, J. S. (2013): Explanatory chapter: Quantitative PCR. In: *Methods in enzymology* 529, S. 279–289. DOI: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00023-9.

Foulke-Abel, J.; In, J.; Yin, J.; Zachos, N. C.; Kovbasnjuk, O.; Estes, M. K.; Jonge, H. de; Donowitz, M. (2016): Human enteroids as a model of upper small intestinal ion transport physiology and pathophysiology. In: *Gastroenterology* 150 (3), 638-649.e8. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.11.047.

Friederich, E.; Pringault, E.; Arpin, M.; Louvard, D. (1990): From the structure to the function of villin, an actin-binding protein of the brush border. In: *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 12 (9), S. 403–408. DOI: 10.1002/bies.950120902.

Frings, M.; Schultheiss, G.; Diener, M. (1999): Electrogenic Ca^{2+} entry in the rat colonic epithelium. In: *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 439 (1-2), S. 39–48. DOI: 10.1007/s004249900159.

Fujii, S.; Suzuki, K.; Kawamoto, A.; Ishibashi, F.; Nakata, T.; Murano, T.; Ito, G.; Shimizu, H.; Mizutani, T.; Oshima, S. et al. (2016): PGE_2 is a direct and robust mediator of anion/fluid secretion by human intestinal epithelial cells. In: *Scientific Reports* 6, S. 36795. DOI: 10.1038/srep36795.

Garcia-Hernandez, V.; Quiros, M.; Nusrat, A. (2017): Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1397 (1), S. 66–79. DOI: 10.1111/nyas.13360.

Gareau, M. G.; Barrett, K. E. (2013): Fluid and electrolyte secretion in the inflamed gut: novel targets for treatment of inflammation-induced diarrhea. In: *Current Opinion in Pharmacology* 13 (6), S. 895–899. DOI: 10.1016/j.coph.2013.08.014.

Gibbs, R. A. (1990): DNA amplification by the polymerase chain reaction. In: *Analytical chemistry* 62 (13), S. 1202–1214. DOI: 10.1021/ac00212a004.

Gleeson, J. P.; Estrada, H. Q.; Yamashita, M.; Svendsen, C. N.; Targan, S. R.; Barrett, R. J. (2020): Development of physiologically responsive human iPSC-derived intestinal epithelium to study barrier dysfunction in IBD. In: *International journal of molecular sciences* 21 (4). DOI: 10.3390/ijms21041438.

Goyal, S.; Tsang, D. K. L.; Maisonneuve, C.; Girardin, S. E. (2021): Sending signals - The microbiota's contribution to intestinal epithelial homeostasis. In: *Microbes and Infection* 23 (6-7), S. 104774. DOI: 10.1016/j.micinf.2020.10.009.

Groschwitz, K. R.; Hogan, S. P. (2009): Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 124 (1), 3-20; quiz 21-2. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.05.038.

Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y. (1985): A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. In: *The Journal of biological chemistry* 260 (6), S. 3440–3450.

- Guan, Q. (2019): A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. In: *Journal of immunology research* 2019, S. 7247238. DOI: 10.1155/2019/7247238.
- Gumbiner, B. (1987): Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. In: *The American journal of physiology* 253 (6 Pt 1), C749-58. DOI: 10.1152/ajpcell.1987.253.6.C749.
- Günzel, D.; Yu, A. S. L. (2013): Claudins and the modulation of tight junction permeability. In: *Physiological reviews* 93 (2), S. 525–569. DOI: 10.1152/physrev.00019.2012.
- Hahn, S.; Nam, M.; Jung H.; Lee, D. H.; Han, H. W.; Kim, D. H. et al (2017): Organoid-based epithelial to mesenchymal transition (OEMT) model: From an intestinal fibrosis perspective. In: *Scientific Reports* 7 (1), S. 2435. DOI: 10.1038/s41598-017-02190-5.
- Haimovitz-Friedman, A.; Kolesnick, R. N.; Fuks, Z. (1997): Ceramide signaling in apoptosis. In: *British medical bulletin* 53 (3), S. 539–553. DOI: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a011629.
- Hansson, G. C. (2012): Role of mucus layers in gut infection and inflammation. In: *Current opinion in microbiology* 15 (1), S. 57–62. DOI: 10.1016/j.mib.2011.11.002.
- Hartmann, C.; Schwietzer, Y. A.; Otani, T.; Furuse, M.; Ebnet, K. (2020): Physiological functions of junctional adhesion molecules (JAMs) in tight junctions. In: *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes* 1862 (9), S. 183299. DOI: 10.1016/j.bbamem.2020.183299.
- Hideharu, H.; Haruo, M. (1994): Fluorescence imaging of intracellular Ca²⁺. In: *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 31 (1), S. 1–10. DOI: 10.1016/1056-8719(94)90023-X.
- Holmgren, J.; Fryklund, J.; Larsson, H. (1989): Gamma-interferon-mediated down-regulation of electrolyte secretion by intestinal epithelial cells: a local immune mechanism? In: *Scandinavian journal of immunology* 30 (4), S. 499–503. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1989.tb02456.x.

Hooper, R.; Samakai, E.; Kedra, J.; Soboloff, J. (2013): Multifaceted roles of STIM proteins. In: *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 465 (10), S. 1383–1396. DOI: 10.1007/s00424-013-1270-8.

Huang, L.-Q.; Zhu, G.-F.; Deng, Y.-Y.; Jiang, W.-Q.; Fang, M.; Chen, C.-B.; Cao, W.; Wen, M.-Y.; Han, Y.-L.; Zeng, H.-K. (2014): Hypertonic saline alleviates cerebral edema by inhibiting microglia-derived TNF- α and IL-1 β -induced Na-K-Cl Cotransporter up-regulation. In: *Journal of neuroinflammation* 11, S. 102. DOI: 10.1186/1742-2094-11-102.

Huang, X.; Oshima, T.; Tomita, T.; Fukui, H.; Miwa, H. (2021): Butyrate alleviates cytokine-induced barrier dysfunction by modifying claudin-2 levels. In: *Biology* 10 (3), S. 205. DOI: 10.3390/biology10030205.

Huyghe, J.; Priem, D.; Bertrand, M. J. M. (2023): Cell death checkpoints in the TNF pathway. In: *Trends in immunology* 44 (8), S. 628–643. DOI: 10.1016/j.it.2023.05.007.

Iwashita, J.; Sato, Y.; Sugaya, H.; Takahashi, N.; Sasaki, H.; Abe, T. (2003): mRNA of MUC2 is stimulated by IL-4, IL-13 or TNF-alpha through a mitogen-activated protein kinase pathway in human colon cancer cells. In: *Immunology and cell biology* 81 (4), S. 275–282. DOI: 10.1046/j.1440-1711.2003.t01-1-01163.x.

Jacob, C.; Yang, P.-C.; Darmoul, D.; Amadesi, S.; Saito, T.; Cottrell, G. S.; Coelho, A.-M.; Singh, P.; Grady, E. F.; Perdue, M. et al. (2005): Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine. Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (36), S. 31936–31948. DOI: 10.1074/jbc.M506338200.

Jadcherla, S. R. (2002): Inflammation inhibits muscarinic signaling in in vivo canine colonic circular smooth muscle cells. In: *Pediatric research* 52 (5), S. 756–762. DOI: 10.1203/00006450-200211000-00024.

Jergens, A. E.; Simpson, K. W. (2012): Inflammatory bowel disease in veterinary medicine. In: *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 4 (4), S. 1404–1419. DOI: 10.2741/e470.

Johansson, M. E. V.; Gustafsson, J. K.; Holmén-Larsson, J.; Jabbar, K. S.; Xia, L.; Xu, H.; Ghishan, F. K.; Carvalho, F. A.; Gewirtz, A. T.; Sjövall, H. et al. (2014): Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. In: *Gut* 63 (2), S. 281–291. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303207.

Johansson, M. E. V.; Larsson, J. M. H.; Hansson, G. C. (2011): The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 Suppl 1 (Suppl 1), S. 4659–4665. DOI: 10.1073/pnas.1006451107.

Johnson, K.; Yin, J.; In, J. G.; Kulkarni, S.; Pasricha, P.; Tse, C. M.; Donowitz, M. (2020): Cholinergic-induced anion secretion in murine jejunal enteroids involves synergy between muscarinic and nicotinic pathways. In: *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 319 (2), C321-C330. DOI: 10.1152/ajpcell.00179.2020.

Jones, L. G.; Vaida, A.; Thompson, L. M.; Ikuomola, F. I.; Caamaño, J. H.; Burkitt, M. D.; Miyajima, F.; Williams, J. M.; Campbell, B. J.; Pritchard, D. M. et al. (2019): NF- κ B2 signalling in enteroids modulates enterocyte responses to secreted factors from bone marrow-derived dendritic cells. In: *Cell death & disease* 10 (12), S. 896. DOI: 10.1038/s41419-019-2129-5.

Jung, S.; Mühle, A.; Schaefer, M.; Strotmann, R.; Schultz, G.; Plant, T. D. (2003): Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (6), S. 3562–3571. DOI: 10.1074/jbc.M211484200.

Kaeffer, B. (2002): Mammalian intestinal epithelial cells in primary culture: A mini-review. In: *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 38 (3), S. 123. DOI: 10.1290/1071-2690(2002)038<0123:MIECIP>2.0.CO;2.

Kakni, P.; López-Iglesias, C.; Truckenmüller, R.; Habibović, P.; Giselbrecht, S. (2023): PSC-derived intestinal organoids with apical-out orientation as a tool to study nutrient uptake, drug absorption and metabolism. In: *Frontiers in molecular biosciences* 10, S. 1102209. DOI: 10.3389/fmolb.2023.1102209.

Kaminsky, L. W.; Al-Sadi, R.; Ma, T. Y. (2021): IL-1 β and the intestinal epithelial tight junction barrier. In: *Frontiers in immunology* 12, S. 767456. DOI: 10.3389/fimmu.2021.767456.

Kang, Y.; Park, H.; Choe, B.-H.; Kang, B. (2022): The role and function of mucins and its relationship to inflammatory bowel disease. In: *Frontiers in Medicine* 9, S. 848344. DOI: 10.3389/fmed.2022.848344.

Kaplan, G. G.; Ng, S. C. (2017): Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease. In: *Gastroenterology* 152 (2), 313-321.e2. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.10.020.

Karlen, Y.; McNair, A.; Perseguers, S.; Mazza, C.; Mermod, N. (2007): Statistical significance of quantitative PCR. In: *BMC bioinformatics* 8, S. 131. DOI: 10.1186/1471-2105-8-131.

Keely, S. J.; Barrett, K. E. (2022): Intestinal secretory mechanisms and diarrhea. In: *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 322 (4), G405-G420. DOI: 10.1152/ajpgi.00316.2021.

Keita, A. V.; Söderholm, J. D. (2010): The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. In: *Neurogastroenterology and motility* 22 (7), S. 718–733. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2010.01498.x.

Kim, M. B.; Hwangbo, S.; Jang, S.; Jo, Y. K. (2022): Bioengineered co-culture of organoids to recapitulate host-microbe interactions. In: *Materials Today Bio* 16, S. 100345. DOI: 10.1016/j.mtbio.2022.100345.

Krebs, J.; Agellon, L. B.; Michalak, M. (2015): Ca²⁺ homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. In: *Biochemical and biophysical research communications* 460 (1), S. 114–121. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.004.

Kubista, M.; Andrade, J. M.; Bengtsson, M.; Forootan, A.; Jonák, J.; Lind, K.; Sindelka, R.; Sjöback, R.; Sjögreen, B.; Strömbom, L. et al. (2006): The real-time polymerase chain reaction. In: *Molecular aspects of medicine* 27 (2-3), S. 95–125. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007.

Laredo, V.; García-Mateo, S.; Martínez-Domínguez, S. J.; La López de Cruz, J.; Gargallo-Puyuelo, C. J.; Gomollón, F. (2023): Risk of cancer in patients with inflammatory bowel diseases and keys for patient management. In: *Cancers* 15 (3). DOI: 10.3390/cancers15030871.

Li, Y.; Soendergaard, C.; Bergenheim, F. H.; Aronoff, D. M.; Milne, G.; Riis, L. B.; Seidelin, J. B.; Jensen, K. B.; Nielsen, O. H. (2018): COX-2-PGE₂ signaling impairs intestinal epithelial regeneration and associates with TNF inhibitor responsiveness in ulcerative colitis. In: *EBioMedicine* 36, S. 497–507. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.08.040.

Lindqvist, S. M.; Sharp, P.; Johnson, I. T.; Satoh, Y.; Williams, M. R. (1998): Acetylcholine-induced calcium signaling along the rat colonic crypt axis. In: *Gastroenterology* 115 (5), S. 1131–1143. DOI: 10.1016/s0016-5085(98)70084-8.

Lopez-Castejon, G.; Brough, D. (2011): Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. In: *Cytokine & growth factor reviews* 22 (4), S. 189–195. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2011.10.001.

Lossi, L. (2022): The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. In: *The Biochemical journal* 479 (3), S. 357–384. DOI: 10.1042/BCJ20210854.

Luettig, J.; Rosenthal, R.; Barmeyer, C.; Schulzke, J. D. (2015): Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. In: *Tissue Barriers* 3 (1-2), e977176. DOI: 10.4161/21688370.2014.977176.

Manicassamy, S.; Manoharan, I. (2014): Mouse models of acute and chronic colitis. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1194, S. 437–448. DOI: 10.1007/978-1-4939-1215-5_25.

Mankertz, J.; Amasheh, M.; Krug, S. M.; Fromm, A.; Amasheh, S.; Hillenbrand, B.; Tavalali, S.; Fromm, M.; Schulzke, J. D. (2009): TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. In: *Cell and tissue research* 336 (1), S. 67–77. DOI: 10.1007/s00441-009-0751-8.

Mankertz, J.; Schulzke, J.-D. (2007): Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. In: *Current opinion in gastroenterology* 23 (4), S. 379–383. DOI: 10.1097/MOG.0b013e32816aa392.

Matsuda, T.; Takuma, K.; Baba, A. (1997): Na⁺-Ca²⁺ exchanger: physiology and pharmacology. In: *Japanese journal of pharmacology* 74 (1), S. 1–20. DOI: 10.1254/jjp.74.1.

McManus, J. F. A. (1948): Histological and histochemical uses of periodic acid. In: *Stain technology* 23 (3), S. 99–108. DOI: 10.3109/10520294809106232.

McElroy, S. J.; Prince, L. S.; Weitkamp, J.-H.; Reese, J.; Slaughter, J. C.; Polk, D. B. (2011): Tumor necrosis factor receptor 1-dependent depletion of mucus in immature small intestine: a potential role in neonatal necrotizing enterocolitis. In: *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 301 (4), G656-66. DOI: 10.1152/ajpgi.00550.2010.

Mertens, S.; Huismans, M. A.; Verissimo, C. S.; Ponsioen, B.; Overmeer, R.; Proost, N.; van Tellingen, O.; van de Ven, M.; Begthel, H.; Boj, S. F. et al. (2023): Drug-repurposing screen on patient-derived organoids identifies therapy-induced vulnerability in KRAS-mutant colon cancer. In: *Cell reports* 42 (4), S. 112324. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112324.

Meyer, F.; Wendling, D.; Demougeot, C.; Prati, C.; Verhoeven, F. (2023): Cytokines and intestinal epithelial permeability: A systematic review. In: *Autoimmunity reviews* 22 (6), S. 103331. DOI: 10.1016/j.autrev.2023.103331.

Mizutani, T.; Clevers, H. (2020): Primary intestinal epithelial organoid culture. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2171, S. 185–200. DOI: 10.1007/978-1-0716-0747-3_11.

Moens, U.; Kostenko, S.; Sveinbjörnsson, B. (2013): The role of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinases (MAPKAPKs) in inflammation. In: *Genes* 4 (2), S. 101–133. DOI: 10.3390/genes4020101.

Nakase, H.; Sato, N.; Mizuno, N.; Ikawa, Y. (2022): The influence of cytokines on the complex pathology of ulcerative colitis. In: *Autoimmunity reviews* 21 (3), S. 103017. DOI: 10.1016/j.autrev.2021.103017.

Nava, P.; Koch, S.; Laukoetter, M. G.; Lee, W. Y.; Kolegraff, K.; Capaldo, C. T.; Beeman, N.; Addis, C.; Gerner-Smidt, K.; Neumaier, I. et al. (2010): Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways. In: *Immunity* 32 (3), S. 392–402. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.03.001.

Negussie, A. B.; Dell, A. C.; Davis, B. A.; Geibel, J. P. (2022): Colonic fluid and electrolyte transport 2022: An update. In: *Cells* 11 (10). DOI: 10.3390/cells11101712.

Neurath, M. F. (2014): Cytokines in inflammatory bowel disease. In: *Nature reviews. Immunology* 14 (5), S. 329–342. DOI: 10.1038/nri3661.

Neurath, M. F. (2024): Strategies for targeting cytokines in inflammatory bowel disease. In: *Nature reviews. Immunology* 24 (8), S. 559–576. DOI: 10.1038/s41577-024-01008-6.

Ninnemann, J. L. (1984): Prostaglandins in inflammation and disease. In: *Immunology today* 5 (6), S. 173–175. DOI: 10.1016/0167-5699(84)90011-2.

Noel, G.; Baetz, N. W.; Staab, J. F.; Donowitz, M.; Kovbasnjuk, O.; Pasetti, M. F.; Zachos, N. C. (2017): A primary human macrophage-enteroid co-culture model to investigate mucosal gut physiology and host-pathogen interactions. In: *Scientific Reports* 7, S. 45270. DOI: 10.1038/srep45270.

Onodera, K.; Pouokam, E.; Diener, M. (2013): STIM1-regulated Ca²⁺ influx across the apical and the basolateral membrane in colonic epithelium. In: *The Journal of membrane biology* 246 (4), S. 271–285. DOI: 10.1007/s00232-013-9528-9.

Onozato, D.; Ogawa, I.; Kida, Y.; Mizuno, S.; Hashita, T.; Iwao, T.; Matsunaga, T. (2021): Generation of budding-like intestinal organoids from human induced pluripotent stem cells. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 110 (7), S. 2637–2650. DOI: 10.1016/j.xphs.2021.03.014.

Oprins, J. C.; Meijer, H. P.; Groot, J. A. (2000): TNF-alpha potentiates the ion secretion induced by muscarinic receptor activation in HT29cl.19A cells. In: *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 278 (3), C463-72. DOI: 10.1152/ajpcell.2000.278.3.C463.

Payvandi, F.; Wu, L.; Haley, M.; Schafer, P. H.; Zhang, L.-H.; Chen, R. S.; Muller, G. W.; Stirling, D. I. (2004): Immunomodulatory drugs inhibit expression of cyclooxygenase-2 from TNF-alpha, IL-1beta, and LPS-stimulated human PBMC in a partially IL-10-dependent manner. In: *Cellular immunology* 230 (2), S. 81–88. DOI: 10.1016/j.cellimm.2004.09.003.

Pérez-Navarro, R.; Ballester, I.; Zarzuelo, A.; Sánchez de Medina, F. (2005): Disturbances in epithelial ionic secretion in different experimental models of colitis. In: *Life sciences* 76 (13), S. 1489–1501. DOI: 10.1016/j.lfs.2004.09.019.

Perl, A. L.; Pokorny, J. L.; Green, K. J. (2024): Desmosomes at a glance. In: *Journal of cell science* 137 (12). DOI: 10.1242/jcs.261899.

Pétrilli, V.; Papin, S.; Dostert, C.; Mayor, A.; Martinon, F.; Tschopp, J. (2007): Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. In: *Cell death and differentiation* 14 (9), S. 1583–1589. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402195.

Pfaffl, M. W.; Horgan, G. W.; Dempfle, L. (2002): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. In: *Nucleic acids research* 30 (9), e36. DOI: 10.1093/nar/30.9.e36.

Pozdeev, V. I.; Lang, E.; Görg, B.; Bidmon, H. J.; Shinde, P. V.; Kircheis, G.; Herebian, D.; Pfeffer, K.; Lang, F.; Häussinger, D. et al. (2017): TNF α induced up-regulation of Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter NKCC1 in hepatic ammonia clearance and cerebral ammonia toxicity. In: *Scientific Reports* 7 (1), S. 7938. DOI: 10.1038/s41598-017-07640-8.

Prasad, S.; Mingrino, R.; Kaukinen, K.; Hayes, K. L.; Powell, R. M.; MacDonald, T. T.; Collins, J. E. (2005): Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. In: *Laboratory Investigation* 85 (9), S. 1139–1162. DOI: 10.1038/labinvest.3700316.

Priyamvada, S.; Gomes, R.; Gill, R. K.; Saksena, S.; Alrefai, W. A.; Dudeja, P. K. (2015): Mechanisms underlying dysregulation of electrolyte absorption in Inflammatory Bowel Disease-associated diarrhea. In: *Inflammatory bowel diseases* 21 (12), S. 2926–2935. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000504.

Puzan, M.; Hosic, S.; Ghio, C.; Koppes, A. (2018): Enteric nervous system regulation of intestinal stem cell differentiation and epithelial monolayer function. In: *Scientific Reports* 8 (1), S. 6313. DOI: 10.1038/s41598-018-24768-3.

Radhakrishnan, V. M.; Ramalingam, R.; Larmonier, C. B.; Thurston, R. D.; Laubitz, D.; Midura-Kiela, M. T.; McFadden, R.-M. T.; Kuro-O, M.; Kiela, P. R.; Ghishan, F. K. (2013): Post-translational loss of renal TRPV5 calcium channel expression, Ca²⁺ wasting, and bone loss in experimental colitis. In: *Gastroenterology* 145 (3), S. 613–624. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.06.002.

Raleigh, D. R.; Marchiando, A. M.; Zhang, Y.; Le Shen; Sasaki, H.; Wang, Y.; Long, M.; Turner, J. R. (2010): Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. In: *Molecular biology of the cell* 21 (7), S. 1200–1213. DOI: 10.1091/mbc.e09-08-0734.

Rogler, G.; Singh, A.; Kavanaugh, A.; Rubin, D. T. (2021): Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: Current concepts, treatment, and implications for disease management. In: *Gastroenterology* 161 (4), S. 1118–1132. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.07.042.

Rosado, J. A.; Sage, S. O. (2001): Activation of store-mediated calcium entry by secretion-like coupling between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type II and human transient receptor potential (hTrp1) channels in human platelets. In: *The Biochemical journal* 356 (1), S. 191. DOI: 10.1042/0264-6021:3560191.

Rosenthal, R.; Milatz, S.; Krug, S. M.; Oelrich, B.; Schulzke, J.-D.; Amasheh, S.; Günzel, D.; Fromm, M. (2010): Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. In: *Journal of cell science* 123 (Pt 11), S. 1913–1921. DOI: 10.1242/jcs.060665.

Ruggiero, V.; Tavernier, J.; Fiers, W.; Baglioni, C. (1986): Induction of the synthesis of tumor necrosis factor receptors by interferon-gamma. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 136 (7), S. 2445–2450. DOI: 10.4049/jimmunol.136.7.2445.

Russell, W. M. S.; Burch, R. L. (1960): The principles of humane experimental technique. In: *Medical Journal of Australia* 1 (30), S. 500. DOI: 10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x.

Saito, A. C.; Higashi, T.; Fukazawa, Y.; Otani, T.; Tauchi, M.; Higashi, A. Y.; Furuse, M.; Chiba, H. (2021a): Occludin and tricellulin facilitate formation of anastomosing tight-junction strand network to improve barrier function. In: *Molecular biology of the cell* 32 (8), S. 722–738. DOI: 10.1091/mbc.E20-07-0464.

Saito, Y.; Shimizu, M.; Iwatsuki, K.; Hanyu, H.; Tadaishi, M.; Sugita-Konishi, Y.; Kobayashi-Hattori, K. (2021b): Effect of short-time treatment with TNF- α on stem cell activity and barrier function in enteroids. In: *Cytotechnology* 73 (4), S. 669–682. DOI: 10.1007/s10616-021-00487-y.

Salido, G. M.; Jardín, I.; Rosado, J. A. (2011): The TRPC ion channels: association with Orail and STIM1 proteins and participation in capacitative and non-capacitative calcium entry. In: *Advances in experimental medicine and biology* 704, S. 413–433. DOI: 10.1007/978-94-007-0265-3_23.

Sánchez de Medina, F.; Pérez, R.; Martínez-Augustin, O.; González, R.; Lorente, M. D.; Gálvez, J.; Zarzuelo, A. (2002): Disturbances of colonic ion secretion in inflammation: role of the enteric nervous system and cAMP. In: *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 444 (3), S. 378–388. DOI: 10.1007/s00424-002-0807-z.

Sanchez-Muñoz, F.; Dominguez-Lopez, A.; Yamamoto-Furusho, J. K. (2008): Role of cytokines in inflammatory bowel disease. In: *WJG* 14 (27), S. 4280. DOI: 10.3748/wjg.14.4280.

Sato, T.; Vries, R. G.; Snippert, H. J.; van de Wetering, M.; Barker, N.; Stange, D. E.; van Es, J. H.; Abo, A.; Kujala, P.; Peters, P. J. et al. (2009): Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. In: *Nature* 459 (7244), S. 262–265. DOI: 10.1038/nature07935.

Schmitz, H.; Fromm, M.; Bode, H.; Scholz, P.; Riecken, E. O.; Schulzke, J. D. (1996): Tumor necrosis factor-alpha induces Cl⁻ and K⁺ secretion in human distal colon driven by prostaglandin E₂. In: *The American journal of physiology* 271 (4 Pt 1), G669-74. DOI: 10.1152/ajpgi.1996.271.4.G669.

Schroder, K.; Hertzog, P. J.; Ravasi, T.; Hume, D. A. (2004): Interferon-gamma: An overview of signals, mechanisms and functions. In: *Journal of leukocyte biology* 75 (2), S. 163–189. DOI: 10.1189/jlb.0603252.

Schultheiss, G.; Frings, M.; Diener, M. (2000): Carbachol-induced Ca²⁺ entry into rat colonic epithelium. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 915, S. 260–263. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05249.x.

Schulzke, J.-D.; Bojarski, C.; Zeissig, S.; Heller, F.; Gitter, A. H.; Fromm, M. (2006): Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1072 (1), S. 288–299. DOI: 10.1196/annals.1326.027.

Schwaller, B. (2010): Cytosolic Ca²⁺ buffers. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2 (11), a004051. DOI: 10.1101/cshperspect.a004051.

Seibert, K.; Zhang, Y.; Leahy, K.; Hauser, S.; Masferrer, J.; Isakson, P. (1997): Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. In: *Advances in experimental medicine and biology* 400A, S. 167–170. DOI: 10.1007/978-1-4615-5325-0_24.

Seno, H.; Sawada, M.; Fukuzawa, H.; Morita-Fujisawa, Y.; Takaishi, S.; Hiai, H.; Chiba, T. (2002): Involvement of tumor necrosis factor alpha in intestinal epithelial cell proliferation following paneth cell destruction. In: *Scandinavian journal of gastroenterology* 37 (2), S. 154–160. DOI: 10.1080/003655202753416803.

Shao, J.; Sheng, G. G.; Mifflin, R. C.; Powell, D. W.; Sheng, H. (2006): Roles of myofibroblasts in prostaglandin E₂-stimulated intestinal epithelial proliferation and angiogenesis. In: *Cancer research* 66 (2), S. 846–855. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2606.

Shen, W.-W.; Frieden, M.; Demaurex, N. (2011): Remodelling of the endoplasmic reticulum during store-operated calcium entry. In: *Biology of the cell* 103 (8), S. 365–380. DOI: 10.1042/BC20100152.

Shi, X.-Z.; Sarna, S. K. (2004): G protein-mediated dysfunction of excitation-contraction coupling in ileal inflammation. In: *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 286 (6), G899-905. DOI: 10.1152/ajpgi.00408.2003.

Singh, U. P.; Singh, N. P.; Murphy, E. A.; Price, R. L.; Fayad, R.; Nagarkatti, M.; Nagarkatti, P. S. (2016): Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. In: *Cytokine* 77, S. 44–49. DOI: 10.1016/j.cyto.2015.10.008.

Steidle, J.; Würner, L.; Diener, M. (2013): Altered response to hydrogen sulphide during experimental colitis in rats. In: *Journal of animal physiology and animal nutrition* 97 (5), S. 942–950. DOI: 10.1111/jpn.12000.

Strabel, D.; Diener, M. (1995): The effect of neuropeptide Y on sodium, chloride and potassium transport across the rat distal colon. In: *British journal of pharmacology* 115 (6), S. 1071–1079. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb15920.x.

Strober, W.; Fuss, I.; Mannon, P. (2007): The fundamental basis of inflammatory bowel disease. In: *The Journal of Clinical Investigation* 117 (3), S. 514–521. DOI: 10.1172/JCI30587.

Takemura, H.; Hughes, A. R.; Thastrup, O.; Putney, J. W. (1989): Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. In: *The Journal of biological chemistry* 264 (21), S. 12266–12271.

Tan, S.; Barker, N. (2015): Epithelial stem cells and intestinal cancer. In: *Seminars in cancer biology* 32, S. 40–53. DOI: 10.1016/j.semcancer.2014.02.005.

Teixeira, L. K.; Fonseca, B. P. F.; Barboza, B. A.; Viola, J. P. B. (2005): The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100 Suppl 1, S. 137–144. DOI: 10.1590/s0074-02762005000900024.

Topper, J. N.; Wasserman, S. M.; Anderson, K. R.; Cai, J.; Falb, D.; Gimbrone, M. A. (1997): Expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter BSC2 is differentially regulated by fluid mechanical and inflammatory cytokine stimuli in vascular endothelium. In: *The Journal of Clinical Investigation* 99 (12), S. 2941–2949. DOI: 10.1172/JCI119489.

Vallee, S.; Laforest, S.; Fouchier, F.; Montero, M. P.; Penel, C.; Champion, S. (2004): Cytokine-induced upregulation of NF-kappaB, IL-8, and ICAM-1 is dependent on colonic cell polarity: implication for PKCdelta. In: *Experimental cell research* 297 (1), S. 165–185. DOI: 10.1016/j.yexcr.2004.03.007.

van der Flier, L. G.; Clevers, H. (2009): Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. In: *Annual review of physiology* 71, S. 241–260 DOI: 10.1146/annurev.physiol.010908.163145.

van der Veen, J. N.; Kennelly, J. P.; Wan, S.; Vance, J. E.; Vance, D. E.; Jacobs, R. L. (2017): The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1859 (9 Pt B), S. 1558–1572. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.04.006.

- van Loo, G.; Bertrand, M. J. M. (2023): Death by TNF: A road to inflammation. In: *Nature reviews. Immunology* 23 (5), S. 289–303. DOI: 10.1038/s41577-022-00792-3.
- van Spaendonk, H.; Ceuleers, H.; Witters, L.; Patteet, E.; Joossens, J.; Augustyns, K.; Lambeir, A.-M.; Meester, I. de; Man, J. G. de; Winter, B. Y. de (2017): Regulation of intestinal permeability: The role of proteases. In: *World journal of gastroenterology* 23 (12), S. 2106–2123. DOI: 10.3748/wjg.v23.i12.2106.
- Wang, F.; Schwarz, B. T.; Graham, W. V.; Wang, Y.; Su, L.; Clayburgh, D. R.; Abraham, C.; Turner, J. R. (2006): IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction. In: *Gastroenterology* 131 (4), S. 1153–1163. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.08.022.
- Wang, F.; Wang, J.; Liu, D.; Su, Y. (2010): Normalizing genes for real-time polymerase chain reaction in epithelial and nonepithelial cells of mouse small intestine. In: *Analytical biochemistry* 399 (2), S. 211–217. DOI: 10.1016/j.ab.2009.12.029.
- Wang, R.; Li, Z.; Liu, S.; Zhang, D. (2023): Global, regional and national burden of inflammatory bowel disease in 204 countries and territories from 1990 to 2019: a systematic analysis based on the Global Burden of Disease Study 2019. In: *BMJ Open* 13 (3), e065186. DOI: 10.1136/bmjopen-2022-065186.
- Waterhouse, C. C.; Stadnyk, A. W. (1999): Rapid expression of IL-1beta by intestinal epithelial cells in vitro. In: *Cellular immunology* 193 (1), S. 1–8. DOI: 10.1006/cimm.1999.1468.
- Weber, A.; Wasiliew, P.; Kracht, M. (2010): Interleukin-1 (IL-1) pathway. In: *Science signaling* 3 (105), cm1. DOI: 10.1126/scisignal.3105cm1.
- Weber, C. R.; Nalle, S. C.; Tretiakova, M.; Rubin, D. T.; Turner, J. R. (2008): Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 88 (10), S. 1110–1120. DOI: 10.1038/labinvest.2008.78.

Wells, R. W.; Blennerhassett, M. G. (2005): Divergent changes to muscarinic and serotonergic signalling following colitis. In: *Gut* 54 (12), S. 1699–1706. DOI: 10.1136/gut.2005.066563.

Wenzl, H. H. (2012): Diarrhea in chronic inflammatory bowel diseases. In: *Gastroenterology Clinics of North America* 41 (3), S. 651–675. DOI: 10.1016/j.gtc.2012.06.006.

Wisner, D. M.; Harris, L. R.; Green, C. L.; Poritz, L. S. (2008): Opposing regulation of the tight junction protein claudin-2 by interferon-gamma and interleukin-4. In: *The Journal of surgical research* 144 (1), S. 1–7. DOI: 10.1016/j.jss.2007.03.059.

Wortzel, I.; Seger, R. (2011): The ERK Cascade: Distinct functions within various subcellular organelles. In: *Genes & cancer* 2 (3), S. 195–209. DOI: 10.1177/1947601911407328.

Woznicki, J. A.; Saini, N.; Flood, P.; Rajaram, S.; Lee, C. M.; Stamou, P.; Skowryra, A.; Bustamante-Garrido, M.; Regazzoni, K.; Crawford, N. et al. (2021): TNF- α synergises with IFN- γ to induce caspase-8-JAK1/2-STAT1-dependent death of intestinal epithelial cells. In: *Cell death & disease* 12 (10), S. 864. DOI: 10.1038/s41419-021-04151-3.

Wu, X.; Weng, L.; Zhang, J.; Liu, X.; Huang, J. (2018): The plasma membrane calcium ATPases in calcium signaling network. In: *Current protein & peptide science* 19 (8), S. 813–822. DOI: 10.2174/1389203719666180416122745.

Xing, C.; Liang, G.; Yu, X.; Zhang, A.; Luo, X.; Liu, Y.; Tang, Z.; Wu, B.; Song, Z.; Lan, D. (2023): Establishment of epithelial inflammatory injury model using intestinal organoid cultures. In: *Stem cells international* 2023, S. 3328655. DOI: 10.1155/2023/3328655.

Xiong, Y.; Wang, C.; Shi, L.; Wang, L.; Zhou, Z.; Chen, D.; Wang, J.; Guo, H. (2017): Myosin light chain kinase: A potential target for treatment of inflammatory diseases. In: *Frontiers in pharmacology* 8, S. 292. DOI: 10.3389/fphar.2017.00292.

Yates, S. L.; Fluhler, E. N.; Lippiello, P. M. (1992): Advances in the use of the fluorescent probe fura-2 for the estimation of intrasynaptosomal calcium. In: *Journal of neuroscience research* 32 (2), S. 255–260. DOI: 10.1002/jnr.490320215.

Yoo, J.-H.; Donowitz, M. (2019): Intestinal enteroids/organoids: A novel platform for drug discovery in inflammatory bowel diseases. In: *World journal of gastroenterology* 25 (30), S. 4125–4147. DOI: 10.3748/wjg.v25.i30.4125.

Yu, Y. R.; Rodriguez, J. R. (2017): Clinical presentation of crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes. In: *Seminars in Pediatric Surgery* 26 (6), S. 349–355. DOI: 10.1053/j.sempedsurg.2017.10.003.

Zhao, Y.; Roy, K.; Vidossich, P.; Cancedda, L.; Vivo, M. de; Forbush, B.; Cao, E. (2022): Structural basis for inhibition of the cation-chloride cotransporter NKCC1 by the diuretic drug bumetanide. In: *Nature communications* 13 (1), S. 2747. DOI: 10.1038/s41467-022-30407-3.

Zietek, T.; Rath, E.; Haller, D.; Daniel, H. (2015): Intestinal organoids for assessing nutrient transport, sensing and incretin secretion. In: *Scientific Reports* 5, S. 16831. DOI: 10.1038/srep16831.

11. Eigene Veröffentlichungen

11.1 Publikation

Pauer, S. M.; Buß, B.; Diener, M.; Ballout, J. (2024): Time-dependent effects of tumor necrosis factor α on Ca^{2+} -dependent secretion in murine small intestinal organoids. In: *Frontiers in physiology* 15, S. 1382238. DOI:10.3389/fphys.2024.1382238.

Ein Teil der Daten, die in der Promotionsschrift dargestellt werden, sind dort publiziert.

11.2 Manuskript in Vorbereitung

Pauer, S. M.; Schindler, A.; Ghezellou, P.; Spengler, B.; Diener, M.; Ballout, J.: Morphological and functional changes of murine small intestinal organoids in response to proinflammatory cytokines – a model for the study of inflammatory processes in vitro. (*in Vorbereitung*)

11.3 Beiträge zu Postern und Vorträgen auf Konferenzen

Pauer, S.; Ballout, J.; Diener, M. (2022): Intestinal organoids as a model for intestinal inflammation. *15th GGL Conference, Gießen*

Pauer, S.; Ballout, J.; Diener, M. (2023): Intestinal organoids as a model for intestinal inflammation. *16th GGL Conference, Gießen*

Ghezellou, P.; Badin, E.; Müller, M. A.; Pauer, S.; Ballout, J.; Pinho dos Reis, V.; Herker, E.; Diener, M.; Strupat, K.; Spengler, B. (2023): Organoid mass spectrometry imaging at ultra-high lateral resolution. *1st IMSIS Conference, Montreal, Canada.*

Pauer, S.M.; Ballout, J.; Diener, M. (2024): TNF α -induced modulation of secretion and Ca²⁺ signaling in small intestinal murine organoids. *23. Barrier- and Transporter-Days, Bad Herrenalb*

Pauer, S.M.; Ballout, J.; Diener, M. (2024): TNF α modulation of secretion and Ca²⁺ signaling in small intestinal murine organoids. *DVG Tagung der Fachgruppe Physiologie und Biochemie, Hannover*

Pauer, S.; Ballout, J.; Diener, M. (2024): TNF α modulation of secretion and Ca²⁺ signaling in small intestinal murine organoids. *17th GGL Conference, Gießen*

Schindler, A.; Badin, E.; Müller, M. A.; Pauer, S.; Ballout, J.; Diener, M.; Strupat, K.; Ghezellou, P.; Spengler, B. (2024): Advanced Imaging of Metabolite Dysfunction in Organoids using Ultra-High Lateral Resolution AP-SMALDI Mass Spectrometry Imaging. *2nd IMSIS Conference, Münster*

Ballout, B.; Pauer, S.; Diener, M. (2024): Proinflammatory cytokines and their effect on murine small intestinal organoid secretion. *Cell Science and Regenerative Medicine, Porto, Portugal*

Schindler, A.; Luh, D.; Pauer, S.; Ballout, J.; Diener, M.; Ghezellou, P.; Spengler, B. (2025): Advanced Imaging of Cytokine-Induced Metabolite Dysfunction in Mouse Small Intestine Organoids using High Lateral Resolution AP-SMALDI Mass Spectrometry Imaging. *56. DGMS-Jahrestagung, Göttingen*

12. Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Prof. Dr. Martin Diener für die exzellente Betreuung während meiner Doktorarbeit. Du hattest jederzeit ein offenes Ohr für alle Anliegen und hast dir auch immer sofort Zeit genommen, um mir bei meinen Fragen, ob nun zu Versuchen, Texten oder technischen Problemen, zu helfen. Das Arbeiten mit dir war stets auf Augenhöhe und deine spürbare Leidenschaft für das, was du tust, war ansteckend.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Jasmin Ballout. Vielen Dank für deine endlose Geduld, mit der du mich bei meinen Versuchen angeleitet und unterstützt hast. Ohne deine Freundschaft und deine Ermutigungen wären diese Jahre viel schwieriger gewesen.

Ein großer Dank geht auch an die lieben TAs unserer Arbeitsgruppe: Alice Stockinger, Brigitta Buß und Barbara Schmidt. Danke für die Unterstützung bei meinen Versuchen, die schönen Unterhaltungen beim Tee und die morgendliche Bestätigung, dass ich mal wieder besonders müde aussehe. Das TA-Zimmer war immer ein schöner Ort, um mal 5 min wieder den Kopf freizubekommen.

Eine emotionale Unterstützung auf vier Pfoten war auch meine liebe Fussel, die mit ihrer lustigen Art alle um den Finger gewickelt hat.

Ich bin sehr dankbar, am Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie meine Doktorarbeit gemacht zu haben. Ich habe in den wunderbaren Mitarbeitenden und besonders den anderen Doktoranden Freunde gefunden, mit denen ich viele schöne Momente, wie etwa beim Frühstück am Freitag oder anderen Feierlichkeiten, verbringen durfte. Prof. Dr. Christoph Rummel danke ich nochmals besonders für sein Engagement in unserer GGL-Section.

Zu guter Letzt geht mein Dank an meine Freunde und Familie: an meine Eltern, die mich während meines Studiums und meiner Doktorarbeit unterstützt haben. An meinen

Danksagung

Bruder Jonas, der mir das Selbstvertrauen gab, Tiermedizin zu studieren. An meine Patentante Kirsten Edinger für das (wiederholte) Lesen meiner Doktorarbeit. An meinen Onkel Prof. Dr. Matthias Edinger, der mich erst für Wissenschaft und Forschung begeistert hat. An meinen Freund Lukas Fornefeld für das gemeinsame Lernen für Klausuren, dafür, dass du meinen Frust ausgehalten hast und mich immer wieder zum Lachen bringst. Sowie an alle weiteren Freunde, die mich in den letzten Jahren unterstützt und begleitet haben.

13. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Svenja Mareike Pauer