$CD103^+CD11b^+$ dendritische Zellen, das Mikrobiom sowie im Dünn- und Dickdarm unterschiedliche Makrophagenpopulationen sind essenziell für einen murinen Postoperativen Ileus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Fakultät für Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Sebastian Gutweiler

aus Konstanz

September, 2019

Gewidmet meinen Eltern und meiner Familie, denen ich für ihre große Unterstützung und Hilfe über all die Jahre sehr dankbar bin.

Bedanken möchte ich mich für Rat und Unterstützung bei allen Mitautoren der Publikation in „Gut" und allen, die meinen wissenschaftlichen Weg begleitet haben, insbesondere Prof. Daniel Engel.

Ebenfalls möchte ich mich bei der Prüfungskommission und den Besuchern meiner Verteidigung für ihre Zeit und ihren Aufwand bedanken.

Dieses Werk ist lizensiert unter der Lizenz Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International (CC-BY-SA). Ein Link zu dieser Lizenz befindet sich in Kapitel 13.

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für experimentelle Immunologie und Bildgebung des Universitätsklinikums Essen und am Institut für experimentelle Immunologie des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Engel

2. Gutachterin: Prof. Dr. Wiebke Hansen

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Astrid Westendorf

Tag der mündlichen Prüfung: 24.6.2020

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN

Offen im Denken

ub universitäts bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/74431
URN: urn:nbn:de:hbz:464-20210617-084249-7

Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 Lizenz (CC BY-S 4.0) genutzt werden.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in: J.-M. Pohl, S Gutweiler, …C Kurts, DR Engel et al. 2017. Irf4-dependent CD103+CD11b+ dendritic cells and the intestinal microbiome regulate monocyte and macrophage activation and intestinal peristalsis in postoperative ileus. *Gut* 66, 12 (December 2017), 2110–2120.

1 Zusammenfassung

Nach operativen Eingriffen im Abdominalraum kann es zu einem Verlust der Darmmotorik, dem Postoperativen Ileus (POI), kommen. Hierbei produzieren Makrophagen (MPs) in der *Muscularis externa* durch das Enzym iNOS den Mediator Stickstoffmonoxid (NO), der die Darmmuskulatur paralysiert. Es ist jedoch unbekannt, welche MPs im Dünn- und Dickdarm zur Paralyse führen und welche Faktoren zur Aktivierung dieser MPs beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die homöostatische *Muscularis externa* von residenten $Ly6C^{-}CX_3CR1^{high}$ MPs besiedelt wird und es nach intestinaler Manipulation zusätzlich zu einem Influx von $Ly6C^{+}CX3CR1^{low}$ MPs kommt. Im Dünndarm exprimieren nach intestinaler Manipulation beide Makrophagengruppen iNOS, im Dickdarm jedoch nur die nach intestinaler Manipulation einwandernden $Ly6C^{+}CX3CR1^{low}$ MPs. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass die alleinige Abwesenheit von $Ly6C^{+}CX3CR1^{low}$ MPs ausreichend zur Reduktion des POI im Dickdarm ist, im Dünndarm jedoch beide Makrophagengruppen depletiert werden müssen, um eine Verbesserung der Darmmotorik zu erreichen.

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit demonstriert werden, dass die Aktivierung der MPs zur iNOS Produktion und der POI von $CD103^{+}CD11b^{+}$ dendritischen Zellen (DZ) und dem Mikrobiom abhängen. Es wurde gezeigt, dass es in *Cd11c*^{cre} *x Irf4*^{flox} Mäusen zu einem Fehlen von $CD103^{+}CD11b^{+}$ DZ kommt und die Expression von iNOS durch MPs nach intestinaler Manipulation deutlich vermindert ist. Ebenso war der Ileus in diesen Mäusen deutlich reduziert. Durch die Gabe von Antibiotika konnte außerdem gezeigt werden, dass die Aktivierung der MPs von einem intakten Mikrobiom im Darm abhängig ist. In Antibiotika behandelten Mäusen waren sowohl iNOS-Expression als auch Ileus vermindert.

Diese Ergebnisse demonstrieren erstmals somit eine neue, pathologische Rolle von $CD103^{+}CD11b^{+}$ DZ und dem Mikrobiom, sowie eine lokal unterschiedliche Abhängigkeit des POI von residenten und einwandernden MPs.

2 English Summary

After abdominal surgery Postoperative Ileus (POI) is one of the most frequent complications leading to a lack of intestinal motility. POI depends on NO production by the enzyme iNOS expressed by macrophages in the *muscularis externa*. However, the mediators activating the MPs and the type of MPs leading to POI are unknown.

This study describes under homeostatic conditions a population of resident $Ly6C^{-}CX_3CR1^{high}$ MPs in the *muscularis externa* and a severe influx of $Ly6C^{+}CX3CR1^{low}$ MPs after intestinal manipulation. We could demonstrate that both subtypes of MPs produced NO after intestinal manipulation in the small intestine, but only $Ly6C^{+}CX3CR1^{low}$ MPs produced NO in the large intestine. Respectively depletion of $Ly6C^{+}CX3CR1^{low}$ MPs in the large intestine was sufficient to reduce POI in the large intestine, while depletion of both, $Ly6C^{+}CX3CR1^{low}$ and $Ly6C^{-}CX_3CR1^{high}$, MP subsets was required to reduce POI in the small intestine.

Furthermore, this study establishes the dependence of POI on $CD103^{+}CD11b^{+}$ dendritic cells (DCs) and the microbiome. We could demonstrate that *Cd11c*^{cre} *x Irf4*^{flox} mice lack $CD103^{+}CD11b^{+}$ DCs in the *muscularis externa* and that iNOS by MPs after intestinal manipulation is severely reduced in these mice. Accordingly, ileus was also ameliorated in the absence of Irf4-dependent DCs. Treatment of mice with antibiotics showed that POI and iNOS production depends on an intact microbiome.

These results demonstrate a new, pathological role of $CD103^{+}CD11b^{+}$ DCs and the microbiome as well as a differential dependence of POI on resident and inflammatory MPs in the large and small intestine.

3 Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung **4**

2 English Summary **5**

3 Inhaltsverzeichnis **6**

4 Einleitung **9**

4.1 Der Aufbau des Darms 9

4.2 Der Postoperative Ileus 10

4.3 Das innate Immunsystem 11

4.3.1 Eigenschaften von Monozyten und Makrophagen 11

4.3.2 Monozyten-Subgruppen im Blut und Knochenmark und ihre Abhängigkeit von CCR2 für die Emigration aus dem Knochenmark 11

4.3.3 Abstammung muriner Gewebsmakrophagen 13

4.3.4 Funktionen von residenten Gewebsmakrophagen in der Lamina propria des Darms 14

4.3.5 Funktionen der von Monozyten abstammenden Ly6C$^+$ Makrophagen in der inflammierten Lamina propria des Darms 15

4.3.6 Funktionen dendritischer Zellen im Darm und den mesenterischen Lymphknoten 16

4.4 Regulation der Darmmotorik und die Immunpathologie des Postoperativen Ileus 18

4.4.1 Residente Makrophagen der Muscularis regulieren unter homöostatischen Bedingungen die Darmmotorik abhängig vom Mikrobiom 19

4.4.2 Makrophagen sind wesentlich für den Verlust der Darmmotorik im Postoperativen Ileus 20

4.4.3 Stickstoffmonoxid ist wesentlich für den Postoperativen Ileus und wird produziert durch das Enzym iNOS in Leukozyten 21

4.4.4 Der Postoperative Ileus ist abhängig von einer immunologischen Kaskade an der dendritische Zellen, T-Zellen und Makrophagen beteiligt sind 23

5 Zielsetzung der Arbeit **25**

6 Material und Methoden **26**

6.1 Material 26

6.1.1 Geräte 26

6.1.2 Verbrauchsmaterialien 29

6.1.3 Reagenzien 30

6.1.4 Antikörper 33

6.1.5 Primer 34

6.1.6 Kits 34

6.1.7 Software 35

6.1.8 Statistische Analyse 36

6.1.9 Mäuse 36

6.2 Puffer und Lösungen 37

6.3 Methoden 39

6.3.1 Gastrointestinale Manipulation des Dünn- oder Dickdarms von Mäusen 39

6.3.2 Messung der Dünndarmmotilität mit Hilfe des FITC-Dextran Transit 39
6.3.3 Bestimmung der Dickdarmmotilität 40
6.3.4 Isolation der Muscularis externa des Dünn- und des Dickdarms 40
6.3.5 Gewinnung von Zellen zur durchflußzytometrischen Analyse aus der Muscularis externa 41
6.3.6 Gewinnung von Zellen aus dem peripheren Blut von Versuchsmäusen 41
6.3.7 Bestimmung der Zellkonzentration in Zellsuspensionen 41
6.3.8 Gewinnung von Knochenmark aus Mäusen 42
6.3.9 Generierung von Knochenmarkschimären 42
6.3.10 Depletion von Blutmonozyten und Markierung von Blutmonozyten 42
6.3.11 Depletion in DTR-Mäusen 42
6.3.12 Antibiotika-Behandlung von Mäusen 43
6.3.13 Durchflußzytometrische Analyse aufgereinigter Zellpopulationen 43
6.3.14 IL-12p70 ELISA Analyse der Muscularis externa 43
6.3.15 IFN-γ ELISA Analyse der Muscularis externa 44
6.3.16 Gewinnung von RNA aus Gewebe 44
6.3.17 Gewinnung von RNA aus sortierten Zellen 44
6.3.18 cDNA-Synthese aus RNA 45
6.3.19 Quantitative RT-PCR aus cDNA 45
6.3.20 Gewinnung von genomischer DNA zur Überprüfung des Genotyps von Cd11c-Cre x Irf4^{flox} Mäusen 45
6.3.21 PCR auf genomische DNA zur Überprüfung des Genotyps von Cd11c-Cre x Irf4^{flox} Mäusen 46
6.3.22 Analytische Agarose-Gelelektrophorese 48

7 Ergebnisse **49**

7.1 Nach Manipulation des Dünndarms kommt es zur Immigration IRF4-abhängiger CD103$^+$CD11b$^+$ dendritischer Zellen 49
7.2 Der Postoperative Ileus hängt von CD103$^+$CD11b$^+$ dendritischen Zellen ab 52
7.3 iNOS von Makrophagen hängt von CD103$^+$CD11b$^+$ dendritischen Zellen ab 54
7.4 Nach intestinaler Manipulation des Dünndarms wandern Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} Monozyten in die *Muscularis* ein, dieser Influx ist in *Ccr2$^{-/-}$* Mäusen deutlich vermindert 56
7.5 Das Fehlen von Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} Makrophagen in *Ccr2$^{-/-}$* Mäusen löst den Postoperativen Ileus nicht auf 59
7.6 Die Depletion von Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} Makrophagen mit Clodronat Liposomen beeinflusst den Ileus ebenfalls nicht 61
7.7 Sowohl Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} als auch Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} Makrophagen sind jeweils hinreichend zur Entstehung eines Postoperativen Ileus im Dünndarm 63
7.8 Zusätzlich zu residenten Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} Makrophagen wandern nach Dünndarmmanipulation Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} Makrophagen in den Dickdarm ein 66
7.9 Der Ileus des Dickdarms hängt von inflammatorischen Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} Makrophagen ab 68
7.10 Residente Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} Makrophagen tragen im Dickdarm nach der Manipulation des Dünn- oder Dickdarms nicht zur Produktion von iNOS bei 70
7.11 Der Postoperative Ileus des Dickdarms hängt vom intestinalen Mikrobiom ab 72

8 Diskussion **74**

9 Quellen **81**

10 Abbildungsverzeichnis **89**

11 Tabellenverzeichnis **91**

12 Abkürzungsverzeichnis **92**

13 Bildquellennachweis **96**

14 Tabellarischer Lebenslauf Sebastian Gutweiler **98**

15 Erklärungen **99**

4 Einleitung

4.1 Der Aufbau des Darms

Der Darm ist das wichtigste Verdauungsorgan des Menschen und erstreckt sich vom Magenpförtner bis zum After (Abb. 1). Er gliedert sich hierbei in den Dünn- und Dickdarm, die am Blinddarm ineinander übergehen. Der Dünndarm ist hauptsächlich für die Verdauung der Nahrung und die Nahrungsaufnahme zuständig, der Dickdarm für eine weitergehende Fermentation der Nahrungsreste mit Hilfe von Bakterien und für die fortschreitende Wasserresorption aus der Nahrung [Lippert 2000].

Histologisch [Lüllmann-Rauch 2012] (Abb. 1) gliedert sich die Darmwand in die *Mucosa*, die aus einem Epithel und der *Lamina propria* besteht, sowie in die *Submucosa und Muscularis externa*. Mit Hilfe des Epithels werden aus dem Darmlumen die Nährstoffe aufgenommen. Die *Lamina propria* (LP) enthält vaskuläre Gefäße und Immunzellen. Hieran grenzt die *Submucosa*, die wiederum größere Gefäße und Gefäße des lymphatischen Systems enthält. Die äußerste Schicht bildet die *Muscularis externa*, ein aus longitudinalen und zirkulären Muskeln bestehendes Gewebe, das sich im Rahmen der Peristaltik rhythmisch kontrahiert und dadurch den Speisebrei durch den Darm befördert. Der Verlust der Peristaltik in der *Muscularis externa* ist charakteristisch für den Postoperativen Ileus (POI), weshalb dieses Gewebe im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wird.

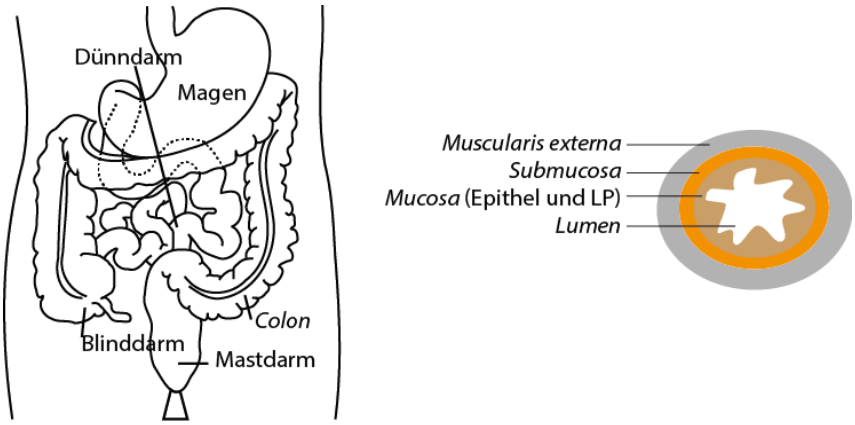

Abb. 1: Anatomie des Darms (links, modifiziert nach [Indolences 2006]) und Querschnitt des Darms (rechts, modifiziert nach [Muller et al. 2014]). LP: *Lamina propria*. Bildquellennachweis sh. Kap. 13.

4.2 Der Postoperative Ileus

Der POI ist eine schwerwiegende Komplikation im Verdauungstrakt, die nach fast allen abdominalen operativen Eingriffen auftritt, in denen der Darm bewegt wurde. Dabei kommt es zu einem Verlust der Darmmotilität des Dick- und Dünndarms, die sich klinisch in ihrer milden Ausprägung als Übelkeit, Erbrechen und Flatulenz manifestiert [Engel et al. 2010; Schwarz et al. 2004; Bauer et al. 2002; Kalff et al. 2015]. Insbesondere der Verlust der Dickdarmmotilität kann zu schwerwiegenden bis tödlichen Komplikationen führen, wobei im Speziellen die Sepsis zu nennen ist [Schwarz et al. 2004].

Die durchschnittlich mehrtägige Dauer eines POI führt zu einer erhöhten Hospitalisierung des Patienten. In diesem Zeitraum wird häufig eine parenterale Ernährung benötigt, das Risiko von Infektionen, Morbidität und Mortalität steigt, die Behandlungskosten erhöhen sich [Iyer et al. 2009; Engel et al. 2010].

Eine Besonderheit des POI stellt die Dissemination dar. Nach einem operativen Eingriff beim Menschen oder einer intestinalen Manipulation in Tiermodellen kommt es zu einem Verlust der Peristaltik nicht nur im manipulierten Abschnitt, sondern der Ileus breitet sich über den gesamten gastrointestinalen Trakt aus [Engel et al. 2010; Schwarz et al. 2004](Abb. 2).

Die Mechanismen des POI sind kaum geklärt. Im Rahmen vorangegangener Studien zeigte sich jedoch ein entscheidender Beitrag des Immunsystems in der Entstehung der Dysmotilität. Hierbei wurde eine Beteiligung des innaten Immunsystems, speziell von Dendritischen Zellen (DZ) und Makrophagen (MPs), als auch des adaptiven Immunsystems, speziell $CD4^+$ mTh1-Zellen, demonstriert [Engel et al. 2010].

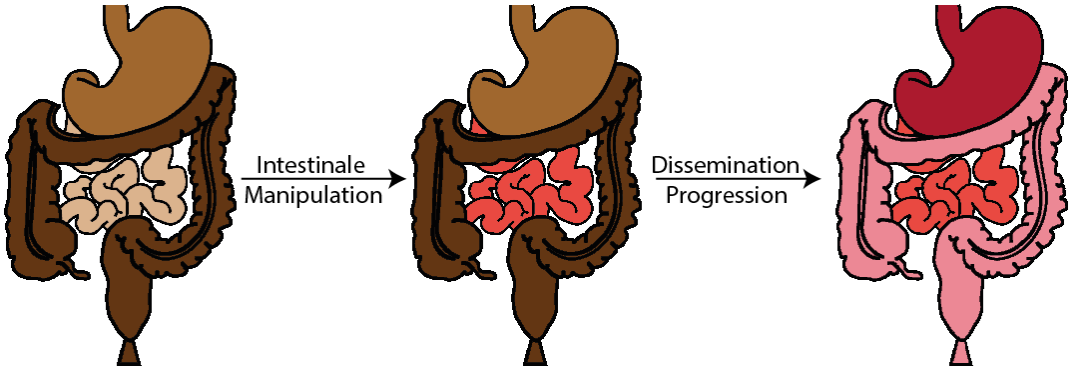

Abb. 2: Progression des POI (rot) nach intestinaler Manipulation (SIM) des Dünndarms (mittleres Bild) und Ausbildung eines POI im restlichen, unmanipulierten gastrointestinalen Trakt (rechtes Bild). Modifiziert nach [Kalff et al. 2015; Schwarz et al. 2004]. Bildquellennachweis sh. Kap. 13.

4.3 Das innate Immunsystem

Das innate Immunsystem, auch angeborenes Immunsystem genannt, erkennt konservierte, pathogene Strukturen. Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem kommt es nach der Erkennung eines Pathogens zu keiner Bildung einer protektiven Gedächtnisantwort auf dieses Pathogen. Neben den physikalischen Barrieren, wie dem Hautepithel und der Darmschleimhaut, sind MPs und Granulozyten zwei Hauptkomponenten des innaten Immunsystems. Als weitere wichtige Komponente kommen sogenannte dendritische Zellen hinzu, die durch die Aktivierung von T-Zellen eine Brücke zwischen dem innaten und dem adaptiven Immunsystem bilden.

4.3.1 Eigenschaften von Monozyten und Makrophagen

Monozyten stellen 4% der Leukozyten im Blut von Mäusen [Auffray et al. 2009] und gehören, neben DZ, zum mononukleären, phagozytären System [Sasmono et al. 2003], das sich vor allem durch die Aufnahme von Partikeln aus seiner Umgebung (Phagozytose) auszeichnet. Monozyten können außerdem, vor allem unter inflammatorischen Bedingungen, in das Gewebe eintreten und residente Gewebsmakrophagen unterstützen (Kap. 4.3.3).

Nach Aufnahme und Verdau von Bakterien und anderen Zellbestandteilen können Monozyten, oder von Monozyten abstammende MPs, inflammatorische Mediatoren und Agenzien produzieren (Kap. 4.3.4), die Bakterien und Viren töten können [Serbina et al. 2008; Auffray et al. 2009; Stuehr and Marletta 1985; Wink et al. 1991]. Des Weiteren können sie unter inflammatorischen Bedingungen das Reservoir bestimmter DZ auffüllen [Randolph et al. 1999] (Kap. 4.3.6).

Speziell im Darm rekonstituieren Monozyten aus dem Blut die residenten Gewebsmakrophagen auch unter homöostatischen Bedingungen (Kap. 4.3.3).

4.3.2 Monozyten-Subgruppen im Blut und Knochenmark und ihre Abhängigkeit von CCR2 für die Emigration aus dem Knochenmark

Monozyten entstammen einer myeloischen Vorläuferzelle im Knochenmark, der sog. MDP-Zelle (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen Vorläufer)[Fogg et al. 2006]. Hierbei entstehen bereits zwei phänotypisch unterschiedliche Subgruppen von Monozyten [Geissmann et al. 2003], die sich so auch im Blut wiederfinden. Auf der einen Seite die sog. $Ly6C^{+}CCR2^{+}CX_3CR1^{low}$ Monozyten, welche auch Ly6C positive ($Ly6C^{+}$) oder

inflammatorische Monozyten genannt werden. Auf der anderen Seite Ly6C⁻CCR2⁻CX$_3$CR1^{High} Monozyten, die auch Ly6C negative (Ly6C⁻) Monozyten oder patrollierende Monozyten genannt werden [Geissmann et al. 2003; Auffray et al. 2007].

Nach ihrer Reifung aus der MDP-Zelle treten Monozyten aus dem Knochenmark in das Blut aus. Der Austritt von Ly6C⁺ Monozyten ist hierbei abhängig von Signalen, die über den CCR2-Rezeptor vermittelt werden (Abb. 3). In transgenen, CCR2 defizienten (*Ccr2*$^{-/-}$) Mäusen kommt es, sowohl unter homöostatischen als auch unter inflammatorischen Bedingungen, zu einer deutlich verminderten Anzahl Ly6C⁺ Monozyten im Blut [Serbina and Pamer 2006] und zu einer verminderten Anzahl von diesen Monozyten abhängigen MPs in peripheren Geweben [Engel et al. 2008], siehe auch Abb. 3.

Außerdem konnte im Rahmen von Transferexperimenten, im Modellsystem der Harnwegsinfektion, gezeigt werden, dass die Extravasation CCR2 defizienter Zellen aus dem Blut in das Gewebe durch das Fehlen von CCR2 nicht verändert ist [Engel et al. 2008].

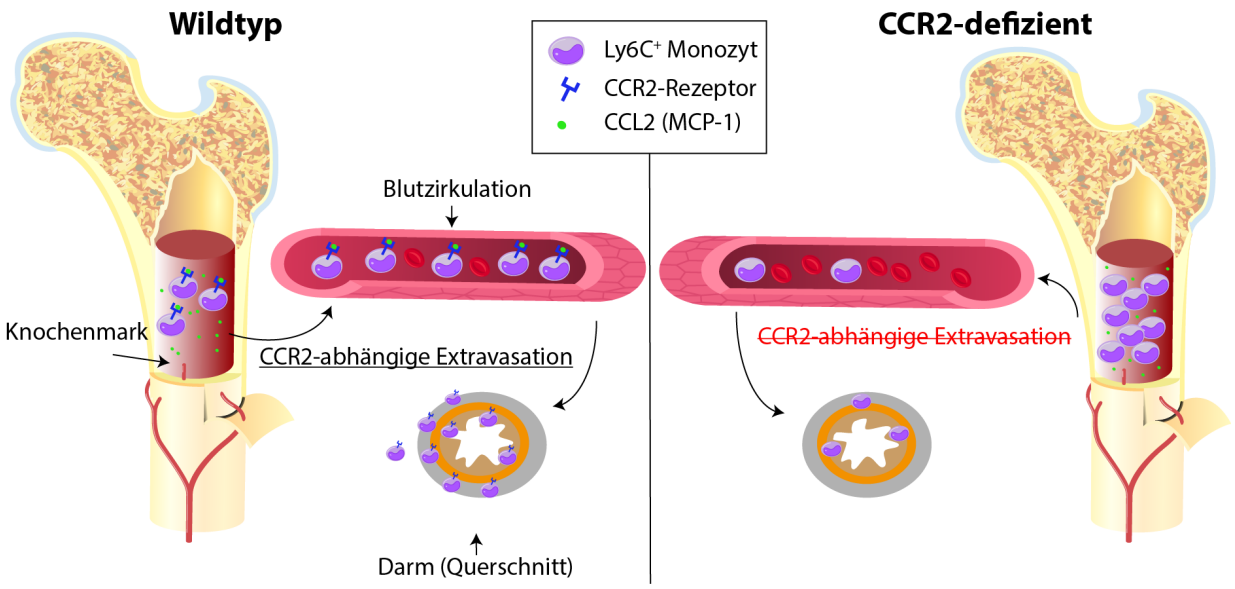

Abb. 3: Die Emigration von Ly6C⁺ Monozyten aus dem Knochenmark ist in CCR2 defizienten Mäusen (rechts) vermindert. Entsprechend ist die Anzahl dieser Zellen in der Zirkulation, und von Ly6C⁺ Monozyten abstammenden Zellen, im Gewebe vermindert. Modifiziert nach [Serbina and Pamer 2006; Engel et al. 2008; Zigmond et al. 2012; Zigmond and Jung 2013]. Bildquellennachweis sh. Kap. 13.

4.3.3 Abstammung muriner Gewebsmakrophagen

Betrachtet man die Entwicklung von Gewebsmakrophagen muss strikt zwischen homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen unterschieden werden.

Unter homöostatischen Bedingungen konnte u.a. für Kupfferzellen, Langerhans-Zellen und Microglia gezeigt werden, dass sich diese Zellen unabhängig vom Knochenmark erneuern (Abb. 4). Für die MPs von Leber, Lunge und Epidermis konnte außerdem eine Abstammung vom Dottersack im Rahmen der embryonalen Entwicklung nachgewiesen werden, die unabhängig vom hämatopoietischen System ist [Gomez Perdiguero et al. 2015]. CX_3CR1 positive und stark den Makrophagenmarker F4/80 exprimierende Zellen wandern im Rahmen der Embryogenese aus dem Dottersack aus und populieren periphere Gewebe [C. Schulz et al. 2012]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte außerdem für viele periphere Gewebe gezeigt werden, dass es, auch im Rahmen der Zellalterung, zu keinem Ersatz der aus embryonalen Vorläufern stammenden Gewebsmakrophagen durch MPs aus dem hämatopoietischen System kommt [Gomez Perdiguero et al. 2015].

Eine andere Situation ergibt sich allerdings in Geweben, die eine Barrierefunktion gegenüber der Umwelt haben. So stammen zwar die Gewebsmakrophagen der Lunge in jungen Mäusen von embryonalen Vorläufern ab [C. Schulz et al. 2012], im Rahmen der Alterung werden diese aber durch hämatopoietische MPs ersetzt [Gomez Perdiguero et al. 2015].

Noch ausgeprägter ist hier die Situation im Darm, der ständigen Umwelteinflüssen ausgesetzt und permanent mit Mikroorganismen besiedelt ist [Caballero and Pamer 2015; DUBOS et al. 1965]. So wurde gezeigt, dass sich unter hämatopoietischen Bedingungen $Ly6C^-$ residente Gewebsmakrophagen in der *Lamina propria* des Darms ständig aus $Ly6C^+$ Blutmonozyten erneuern (Abb. 4) [Zigmond and Jung 2013; Varol, Vallon-Eberhard, et al. 2009; Varol, Yona, et al. 2009; Tamoutounour et al. 2012; Zigmond et al. 2012; Bain et al. 2013].

Unter inflammatorischen Bedingungen konnte hingegen nachgewiesen werden, dass es in verschiedenen Geweben zu einer Einwanderung von $Ly6C^+$ Monozyten kommt [Serbina and Pamer 2006; Shi and Pamer 2011; Engel et al. 2008]. Hierbei bildet auch die *Lamina propria* des Darms keine Ausnahme, in die bei Entzündungen $Ly6C^+$ Monozyten aus dem Blut einwandern. Unter inflammatorischen Bedingungen

einwandernde Ly6C+ Monozyten behalten allerdings, im Gegensatz zu unter homöostatischen Bedingungen einwandernden Ly6C+ Monozyten, ihre Ly6C-Expression und erfüllen pro-inflammatorische Funktionen [Weber et al. 2011] (Kap. 4.3.4 und Abb. 5).

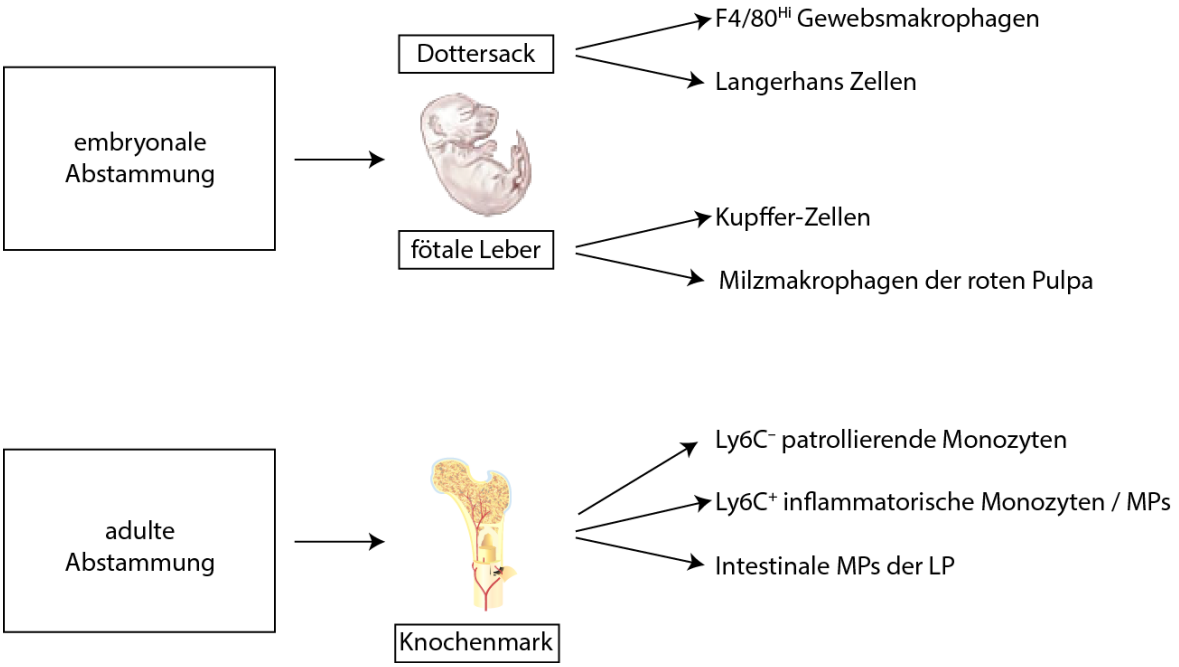

Abb. 4: Gewebsmakrophagen und Monozyten unterschiedlicher Gewebe stammen in ihrer Entwicklung aus unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten und Kompartimenten. Modifiziert nach [Fejer et al. 2015; Geissmann et al. 2003; C. Schulz et al. 2012; Zigmond et al. 2012; Gomez Perdiguero et al. 2015; Yona et al. 2013]. Bildquellennachweis sh. Kap. 13.

4.3.4 Funktionen von residenten Gewebsmakrophagen in der *Lamina propria* des Darms

Von Monozyten abgeleitete MPs im Darm stellen das größte Reservoir an MPs in der Maus dar [Zigmond and Jung 2013; Lee et al. 1985]. Diese residenten Darmmakrophagen in der *Lamina propria* werden durch die Expression der Oberflächenmarker CD11b, F4/80, dem F_c–γ Rezeptor CD64 und durch eine besonders hohe Expression des Chemokinrezeptors CX_3CR1 charakterisiert [Zigmond and Jung 2013; Lee et al. 1985; Tamoutounour et al. 2012; Niess et al. 2005] (Abb. 5).

Im gesunden Darm besteht ein stabiles Equilibrium zwischen der Besiedlung des Darms durch das Mikrobiom und der Immunreaktion [Zigmond and Jung 2013; Rivollier et al. 2012; Zigmond et al. 2012]. Die Rolle der residenten MPs hierbei wird kontrovers diskutiert [Zigmond and Jung 2013]. In früheren Studien konnte unter anderem gezeigt werden, dass Dendriten residenter MPs in das Lumen eindringen und dort Pathogene

aufnehmen [Rescigno et al. 2001; Hapfelmeier et al. 2008]. Entsprechend wurden diese Zellen als dendritische Zellen (DZ) benannt. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass die intraluminalen Dendriten für eine Immunreaktion nicht essentiell sind und durch alternative Wege ersetzt werden können [O. Schulz et al. 2009]. Hierzu passend konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit dieser residenten MPs, T-Zellen zu aktivieren, im Vergleich zu DZ, nur schwach ausgeprägt ist [O. Schulz et al. 2009]. Auch fehlt diesen MPs unter homöostatischen Bedingungen die Fähigkeit in mesenterische Lymphknoten (mLN) zu wandern [Bogunovic et al. 2009; O. Schulz et al. 2009; Jang et al. 2006]. Beides sind wichtige Funktionen von DZ. Demzufolge werden diese CD64 und CX_3CR1 exprimierenden Zellen heute, im Gegensatz zu früheren Studien, als MPs und nicht als DZ behandelt [Varol et al. 2010; Rivollier et al. 2012; Tamoutounour et al. 2012].

Stattdessen konnte für diese residenten MPs eine immunregulatorische Rolle nachgewiesen werden (Abb. 5). Es konnte gezeigt werden, dass MPs der *Lamina propria* das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 produzieren [Murai et al. 2009] und für die Generierung von regulatorischen T-Zellen in der *Lamina propria* verantwortlich sind [Denning et al. 2007].

Abseits von Immunfunktionen wurde außerdem beobachtet, dass diese MPs an der Wundheilung beteiligt sind [Pull et al. 2005; Seno et al. 2009; Zigmond et al. 2014]. Insgesamt wird den residenten MPs der *Lamina propria* unter homöostatischen Bedingungen, die im Darm durch einen ständigen Kontakt zwischen Mikrobiom und Immunsystem geprägt sind, eine immunregulierende statt eine inflammatorische Funktion zugeschrieben (Abb. 5).

Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass diese Zellen antiinflammatorische Gene exprimieren [Rivollier et al. 2012; Zigmond et al. 2012], deren antiinflammatorische Wirkung auch durch inflammatorische Stimuli, wie DSS-Gabe (Natrium-Dextransulfat), nicht aufgehoben werden kann [Zigmond et al. 2012].

4.3.5 Funktionen der von Monozyten abstammenden Ly6C$^+$ Makrophagen in der inflammierten *Lamina propria* des Darms

In inflammatorischen Modellen wurde nachgewiesen, dass Ly6C$^+$ Monozyten in die entzündete *Lamina propria* einwandern [Platt et al. 2010; Weber et al. 2011]. Hierbei unterscheiden sich diese MPs durch eine höhere Ly6C- und eine niedrigere CX_3CR1-Expression von residenten Gewebsmakrophagen (Abb. 5). Sie weisen in ihrer

Genexpression einen inflammatorischen Phänotyp auf [Weber et al. 2011], folgerichtig konnte durch die konditionale Depletion dieser Zellen eine Verminderung des inflammatorischen Prozesses erreicht werden [Zigmond et al. 2012]. Diese Beobachtungen werden von *in vitro* Versuchen unterstützt. Hierbei wurde festgestellt, dass Ly6C^{+}CX$_3$CR1^{low} MPs nach TLR Stimulation proinflammatorische Zytokine produzieren, während dies für residente Ly6C^{-}CX3CR1^{high} MPs nicht gilt [Zigmond et al. 2012] (Abb. 5).

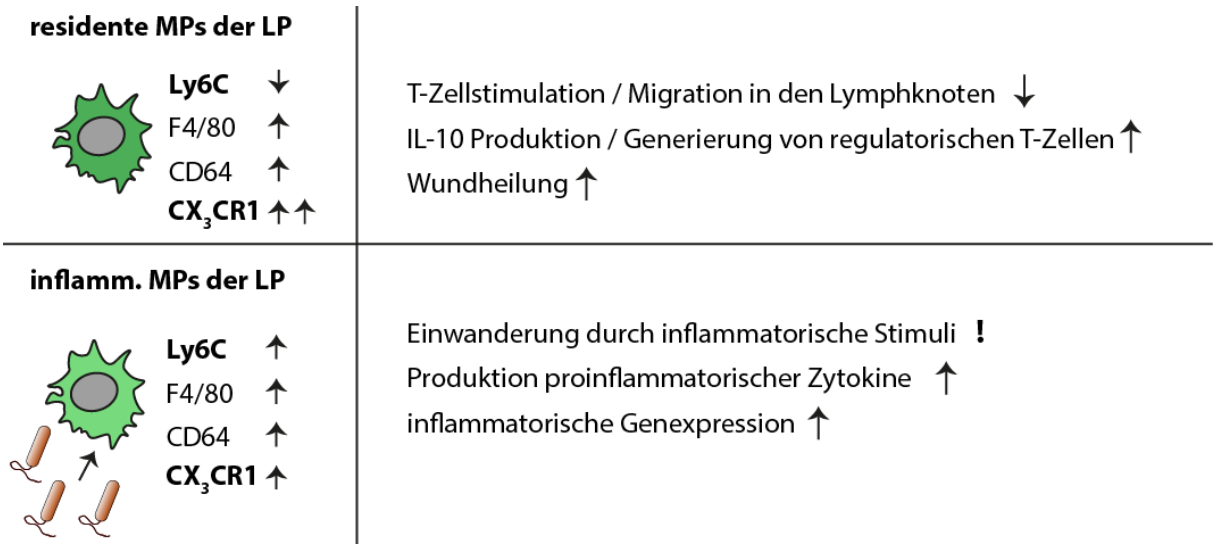

Abb. 5: Residente und inflammatorische MPs exprimieren unterschiedliche Marker und erfüllen unterschiedliche Funktionen in der *Lamina propria* (LP) des Darms. Zusammenstellung der Tabelle nach [Zigmond et al. 2012; Weber et al. 2011; Platt et al. 2010; Rivollier et al. 2012; Bogunovic et al. 2009; O. Schulz et al. 2009]. Bildquellennachweis sh. Kap. 13.

4.3.6 Funktionen dendritischer Zellen im Darm und den mesenterischen Lymphknoten

DZ und MPs haben unterschiedliche, sich aber auch ergänzende Funktionen. Im Gegensatz zu MPs sind DZ durch ihre Migration in die mLN und die, im Vergleich zu MPs, bessere Aktivierung von T-Zellen definiert [Gross et al. 2015]. Die Hauptaufgabe von DZ besteht hierbei in der Präsentation von Antigenen zu T-Zellen.

DZ des Darms werden über die Expression der Oberflächenantigene CD11c und CD103 definiert [Bogunovic et al. 2009; Varol, Vallon-Eberhard, et al. 2009; O. Schulz et al. 2009]. Diese CD103^{+} DZ teilen sich wiederum in zwei Untergruppen, die CD103^{+}CD11b^{+} und die CD103^{+}CD11b^{-} DZ.

CD103^{+}CD11b^{+} DZ sind in ihrer Entwicklung verwandt zu CD11b^{+}CD8α^{-} DZ der Milz [Klebanoff et al. 2013]. Die höchste Anzahl wird in der *Lamina propria* (LP) des

Dünndarms erreicht, während die LP des Dickdarms kaum besiedelt ist [Denning et al. 2011]. Sie wandern CCR7-abhängig in die mLN und präsentieren Antigene zu T-Zellen [Jang et al. 2006; Cerovic et al. 2014]. Ihre Entwicklung ist abhängig von IRF-4 [Persson et al. 2013] und Notch-2 [Lewis et al. 2011; Satpathy et al. 2013]. Funktionell wurde eine Rolle in der Th_{17}-Differenzierung von T-Zellen durch $CD103^+CD11b^+$ DZ nachgewiesen [Persson et al. 2013] .

$CD103^+CD11b^-$ DZ sind in ihrer Entwicklung verwandt zu $CD8\alpha^+$ DZ [Edelson et al. 2010]. Man findet sie auch in anderen peripheren Organen wie der Niere [Evers et al. 2016]. Ihre Entstehung ist abhängig von den Transkriptionsfaktoren BATF3 und IRF8, außerdem exprimieren sie den Chemokinrezeptor XCR1 [Becker et al. 2014; Crozat et al. 2010; Edelson et al. 2010]. Funktionell sind sie in der Kreuzpräsentation spezialisiert und an der Differenzierung von $CD8^+$ Effektor-T-Zellen und IFN-γ produzierenden T-Zellen beteiligt [Cerovic et al. 2015].

Neuere Studien beschreiben eine weitere, dritte, $CD103^-$ Population DZ. Diese exprimieren CD11b und CX_3CR1, unterscheiden sich allerdings von MPs durch ihre fehlende Expression des Makrophagenmarkers CD64 [Tamoutounour et al. 2012; Scott et al. 2015]. Sie entstehen aus $Ly6C^+$ Monozyten [Bogunovic et al. 2009] und induzieren IL-17 sowie IFN-γ produzierende T-Zellen [Cerovic et al. 2013; Scott et al. 2015].

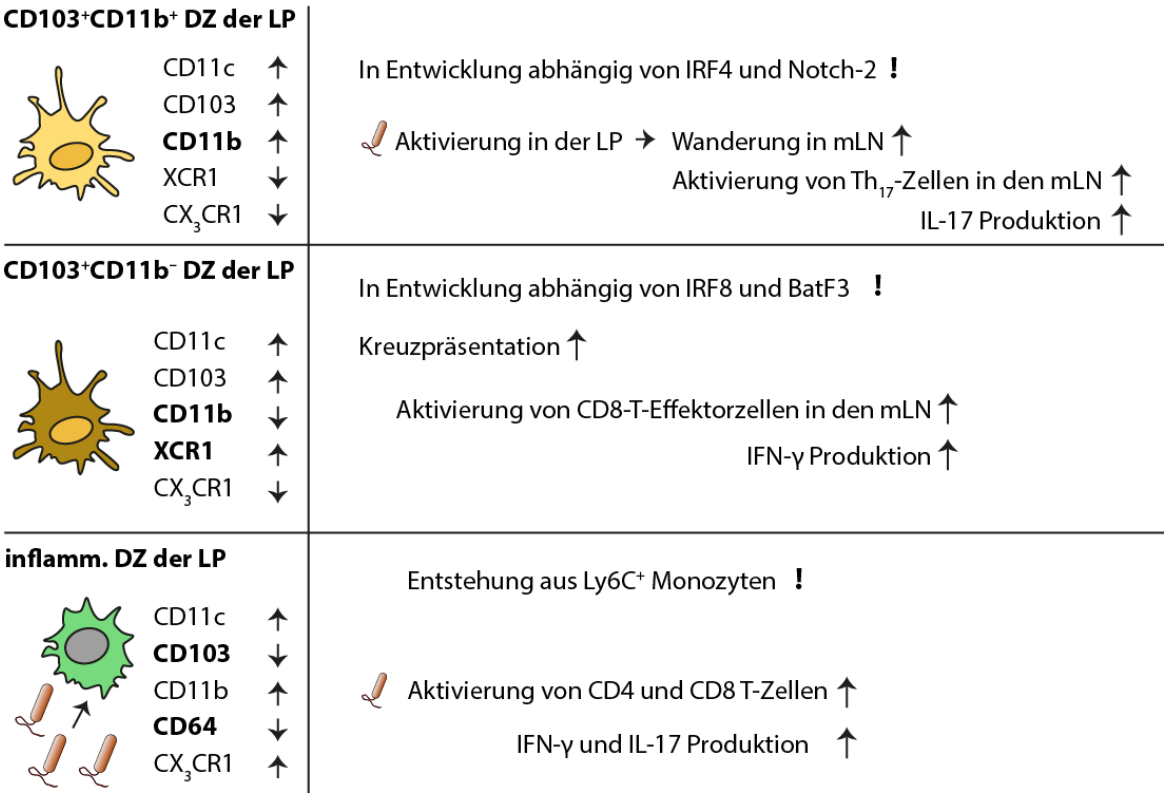

Abb. 6: Markerexpression, Abstammung und Funktion unterschiedlicher DZ in der *Lamina propria* des Mäusedarms. Zusammenstellung der Tabelle nach [Bogunovic et al. 2009; Varol, Vallon-Eberhard, et al. 2009; Klebanoff et al. 2013; Gross et al. 2015; Cerovic et al. 2014; Persson et al. 2013; Scott et al. 2015; Tamoutounour et al. 2012; Bain et al. 2013; Cerovic et al. 2015]. Bildquellennachweis sh. Kap. 13.

4.4 Regulation der Darmmotorik und die Immunpathologie des Postoperativen Ileus

Der POI entsteht, wie oben beschrieben, durch einen Verlust der Magen– und Darmmotorik im gesamten gastrointestinalen Trakt. In verschiedenen Studien der letzten Jahre konnte eine Beteiligung des Immunsystems an diesem Verlust der Motorik nachgewiesen werden. Im folgenden Abschnitt soll kurz auf die Regulation der Darmmotorik unter normalen Bedingungen, dann auf deren Verlust nach operativen Eingriffen eingegangen werden.

4.4.1 Residente Makrophagen der *Muscularis* regulieren unter homöostatischen Bedingungen die Darmmotorik abhängig vom Mikrobiom

Ein Zusammenspiel zwischen enterischen Neuronen, residenten MPs und dem Mikrobiom reguliert die Darmmotorik in der *Muscularis* [Muller et al. 2014]. In der *Muscularis* existiert ein Netzwerk residenter $Ly6C^{-}CX_3CR1^{high}$ MPs, die eine ähnliche Markerexpression wie residente MPs in der *Lamina propria* aufweisen, allerdings den CSF1-Rezeptor (CSF1R, *Colony Stimulating Factor 1 Receptor*) stärker exprimieren.

Diese residenten MPs regulieren über die Sekretion des Proteins BMP2 (*Bone morphogenetic protein 2*), welches über Aktivierung des zugehörigen Rezeptors BMPR auf enterische Neurone wirkt, die Kontraktion der glatten Muskulatur der *Muscularis*. Enterische Neurone sekretieren dann den Wachstumsfaktor CSF1, der für die Entwicklung der residenten MPs benötigt wird [Muller et al. 2014].

Das Mikrobiom wiederum reguliert positiv die Produktion von BMP2 und CSF1 durch MPs bzw. enterische Neurone [Muller et al. 2014].

Somit entsteht ein komplexes Wechselspiel zwischen MPs, enterischen Neuronen und dem Mikrobiom, welches schlussendlich die Darmmotorik unter homöostatischen Bedingungen reguliert (Abb. 7).

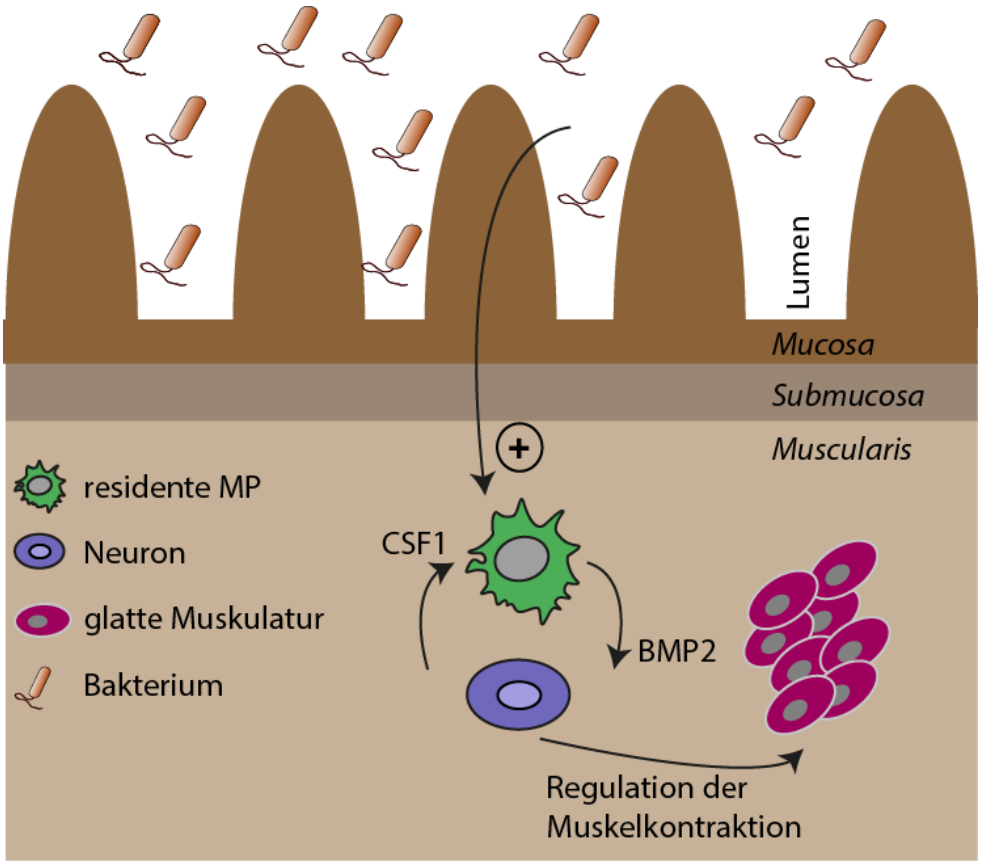

Abb. 7: Residente MPs regulieren abhängig vom Mikrobiom die Muskelkontraktion unter homöostatischen Bedingungen (CSF1: Colony Stimulating Factor 1; BMP2: Bone Morpogenetic Protein 2). Modifizert nach [Muller et al. 2014]. Bildquellennachweis sh. Kap. 13.

4.4.2 Makrophagen sind wesentlich für den Verlust der Darmmotorik im Postoperativen Ileus

In Mausmodellen konnte eine Beteiligung von MPs am POI nachgewiesen werden. Hierzu wurde, unter Betäubung, der Dünndarm der Maus mechanisch manipuliert und anschließend Darmmotorik und Immunantwort näher untersucht.

Es zeigte sich ein starker Anstieg der Leukozyten [Kalff et al. 1999]. Gleichzeitig kommt es zu einem Anstieg inflammatorischer Mediatoren, die die Funktion von MPs beeinflussen, wie dem Faktor MIP-1α (Macrophage Inflammatory Protein-1α) [Wehner et al. 2007]. Die Abwesenheit von MPs durch chemische Depletion [Wehner et al. 2007] oder genetische Depletion, herbeigeführt in Osteopetrose-Mäusen [Mikkelsen and Thuneberg 1999], verringerte die Expression proinflammatorischer Zytokine und der für die Rekrutierung von Leukozyten zuständigen Proteine ICAM-1 und MCP-1 [Wehner et al. 2007; Mikkelsen and Thuneberg 1999; Türler et al. 2002].

Eines der wichtigsten Studienergebnisse war jedoch, dass das Fehlen von MPs nach der Manipulation des Darms die Darmmotorik erhöht [Wehner et al. 2007; Wehner et al.

2009] und es somit zu einem verminderten POI kommt. Dies bedeutet, dass der POI von MPs abhängig ist. Der spezifisch benötigte Makrophagen-Subtyp ist jedoch weiterhin unbekannt.

4.4.3 Stickstoffmonoxid ist wesentlich für den Postoperativen Ileus und wird produziert durch das Enzym iNOS in Leukozyten

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger, biologischer Signalgeber, der in einer Vielzahl von Prozessen eine Rolle spielt. Für eine seiner wichtigsten Funktionen ist NO auch unter dem Namen EDRF (Endothelium-Derived Relaxing Factor; aus dem Endothel stammender relaxierender Faktor) bekannt, für dessen Entdeckung der Nobelpreis an Robert Furchgott, Louis Ignarro und Ferid Murad vergeben wurde [Ignarro 2000; Palmer et al. 1987; Moncada and Higgs 2006]. Hierbei wird im Endothel durch das Enzym eNOS (endotheliale NO-Synthase) der Mediator NO produziert, der in die glatte Muskulatur diffundiert. Er sorgt dort, über die Aktivierung der zyklischen Guanylatzyklase (G-cyclase) mittels cGMP-Produktion und Aktivierung einer cGMP abhängigen Kinase (G-kinase), für erhöhte Proteinphosphorylierung in der glatten Muskulatur. Dies führt zur Relaxation der glatten Muskulatur [Ignarro 2000; Furchgott et al. 1984; Diamond 1978] (Abb. 8).

Eine Besonderheit von NO als Signalmolekül ist seine hohe chemische Reaktivität, da es als Radikal vorliegt. Diese hohe Reaktivität ist wichtig für eine weitere Funktion von NO, nämlich seine Beteiligung an der innaten Immunantwort [Iyengar et al. 1987].

MPs produzieren nach Aktivierung NO, welches als freies Radikal toxisch für Bakterien und intrazelluläre Parasiten ist [Klotz et al. 1995; Seguin 1994; Mellouk et al. 1991; Green et al. 1990]), unter anderem indem es DNA-Schäden einführt [Li et al. 2006; Nguyen et al. 1992; Wink et al. 1991]. Die Produktion von NO durch MPs ist hierbei abhängig von dem Enzym iNOS (inducible NO-Synthase), welches transkriptionell reguliert wird [Aktan 2004; Xie et al. 1992; Lowenstein et al. 1993] (Abb. 8). Einer der wichtigsten Faktoren um die iNOS, und somit die NO, Produktion anzuregen ist IFN-γ [Green et al. 1994; Kamijo et al. 1995; Lowenstein et al. 1993]. Dieser Mediator wird hauptsächlich durch T-Zellen und NK/NKT-Zellen produziert.

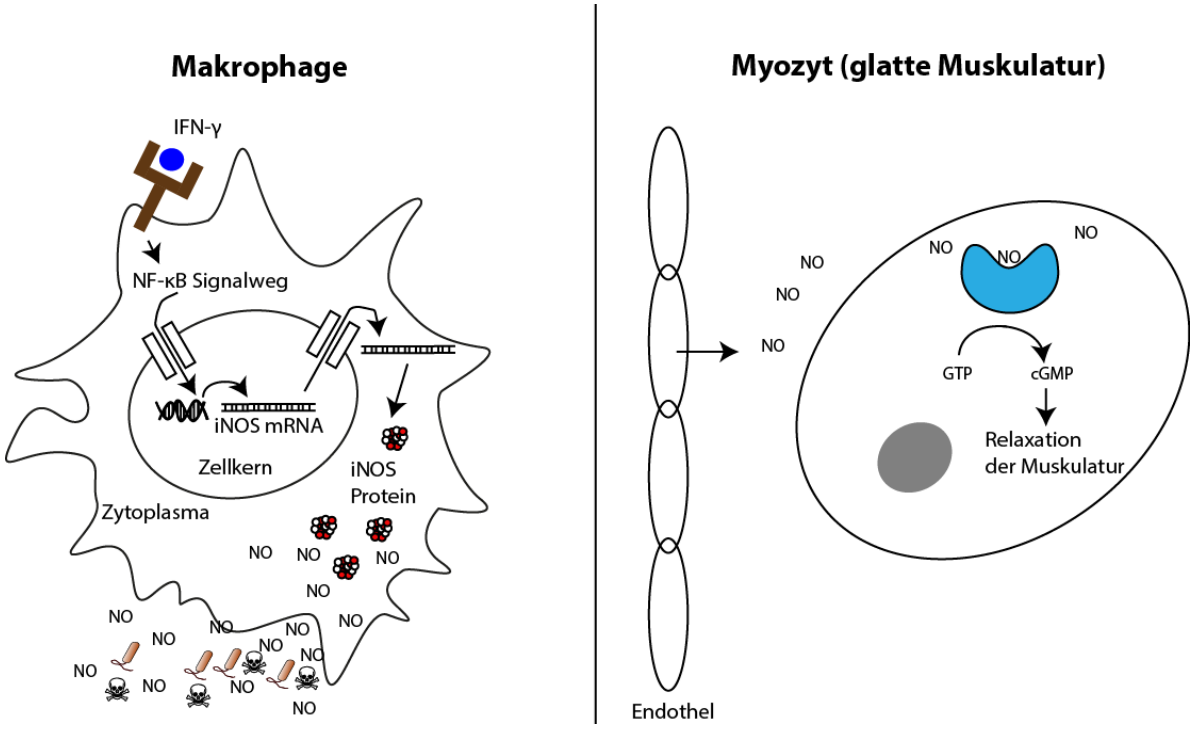

Abb. 8: NO wird von MPs im Rahmen der bakteriellen Abwehr produziert und relaxiert die glatte Muskulatur in Myozyten. IFN-γ ist ein wesentlicher Mediator um transkriptionell die NO-Produktion zu aktivieren. Modifiziert nach [Ignarro 2000; Aktan 2004; Klotz et al. 1995; Green et al. 1994; Chalfie et al. 1994; Kamijo et al. 1995; Lowenstein et al. 1993; Xie et al. 1992; Xie et al. 1994; Furchgott et al. 1984; Palmer et al. 1987; Diamond 1978]. Bildquellennachweis sh. Kap. 13.

Entsprechend der oben beschriebenen, bekannten Funktionen von NO wurde die Rolle dieses Mediators im POI untersucht. In der Tat zeigte sich eine essentielle Abhängigkeit des POI von NO und auch von dem durch MPs produzierten Mediator iNOS. So wurde eine transkriptionelle Hochregulation von iNOS nach der chirurgischen Manipulation des Darms in Nagetieren festgestellt [Kalff et al. 2000]. In weiteren Experimenten zeigte sich die funktionelle Bedeutung von NO für den POI. Eine Blockade der NO-Bildung mit pharmakologischen Inhibitoren reduzierte den POI [Kalff et al. 2000]. Eines der wichtigsten Ergebnisse war jedoch, dass das Fehlen von iNOS in Mäusen ($iNOS^{-/-}$) den POI beseitigte. Dieser Effekt war auch in Chimären sichtbar, deren Knochenmark durch iNOS defizientes Knochenmark ersetzt wurde [Türler et al. 2006]. Somit war die Bedeutung von iNOS, das durch knochenmarksabhängige Leukozyten produziert wird, für den POI nachgewiesen.

4.4.4 Der Postoperative Ileus ist abhängig von einer immunologischen Kaskade an der dendritische Zellen, T-Zellen und Makrophagen beteiligt sind

In einer Studie von *Engel et al* [Engel et al. 2010] konnten weitere wesentliche Aspekte, die zur Bildung eines POI führen, aufgeklärt werden. Hierbei war eine bedeutende Erkenntnis, dass sowohl die Depletion von DZ, als auch von T-Zellen, die Bildung eines POI verhindern [Engel et al. 2010]. Eine Depletion von NK-Zellen, als auch von regulatorischen T-Zellen, hatte hingegen keinen Effekt.

Die Studie konnte außerdem beweisen, dass es nach der Manipulation des Darms zur Bildung der Mediatoren IL-12 und IFN-γ kommt, und dass deren Fehlen ebenfalls zu einem verminderten POI führt, sowie dass IL-12 nach der intestinalen Manipulation durch $CD103^{+}CD11b^{+}$ DZ produziert wird. Außerdem verminderte die genetische Depletion von IL-12 die Produktion von IFN-γ. In weiteren Experimenten wurde demonstriert, dass $CD4^{+}$ Gedächtnis-Th1-Zellen (mTh1), aktiviert durch IL-12, IFN-γ produzieren, welches wiederum die iNOS und NO Produktion in MPs aktiviert. Entsprechend führte ein Unterbrechen dieser Kaskade mittels genetischer Depletion von IL-12 und IFN-γ zu einer verminderten iNOS-Produktion [Engel et al. 2010].

Im Rahmen dieser Studie wurde auch die Disseminierung des POI von manipulierten in unmanipulierte Regionen des Gastrointestinaltrakts untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die aktivierten T-Zellen vom manipulierten Dünndarm in den unmanipulierten Dickdarm wandern und dort ebenfalls IFN-γ produzieren [Engel et al. 2010].

Zusammenfassend ergab sich somit eine Kaskade, in der DZ nach Manipulation und mittels eines unbekannten Stimulus aktiviert werden und IL-12 produzieren. Dieses IL-12 wiederum aktiviert $CD4^{+}$ mTh1-Zellen zur Produktion von IFN-γ, welches dann MPs zur NO Produktion mittels iNOS aktiviert. Dies hat die Relaxation der glatten Muskulatur und den Ileus zur Folge (Abb. 9).

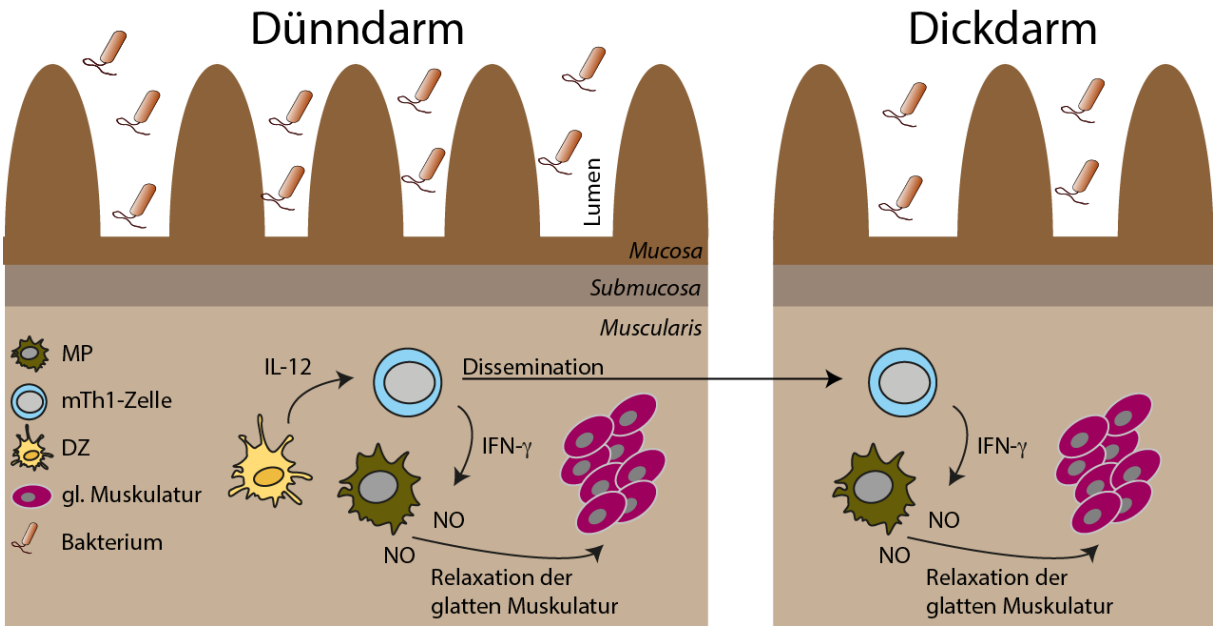

Abb. 9: Dendritische und Gedächtnis-Th1-Zellen (mTh1) regen nach intestinaler Manipulation des Dünndarms über eine Il-12 IFN-γ Kaskade die NO Produktion in MPs an und lösen somit einen Ileus aus. Aktivierte mTh1-Zellen disseminieren in den Dickdarm und lösen dort über IFN-γ ebenfalls eine zum Ileus führende Kaskade aus. Modifiziert nach [Engel et al. 2010]. Bildquellennachweis sh. Kap. 13.

5 Zielsetzung der Arbeit

Zwar ist eine Beteiligung von MPs am pathologischen Verlauf des POI in der vorhandenen Literatur gut dokumentiert, jedoch sind Art und Herkunft dieser MPs komplett unverstanden. Auch die Beteiligung von MPs am POI des Dickdarms ist kaum untersucht.

In der Literatur wurde eine Beteiligung von DZ an der Pathogenese des POI demonstriert, jedoch konnte bisher keine funktionale Beteiligung spezifischer DZ am Verlust der Darmmotorik gezeigt werden. Des Weiteren ist kein Pathogen nachgewiesen, das zur Aktivierung der immunologischen Kaskade führt.

Zur Untersuchung dieser offenen Punkte wurde als Arbeitshypothese von einer wesentlichen Beteiligung inflammatorischer MPs aus dem Blut und von $CD103^{+}CD11b^{+}$ DZ am POI ausgegangen, weil diese in Pilotexperimenten die jeweils am stärksten vertretenen Zellpopulationen nach Manipulation stellten und die vorhandene Literatur auf eine Beteiligung dieser Zellen am POI hinweist.

Durch Depletion dieser Zellpopulationen sollte deren Beteiligung am POI bestimmt werden. Um die Entstehung des POI untersuchen zu können, sollten hierzu deskriptive, die Zellen näher definierende Daten, sowie funktionale Daten, die eine Veränderung des POI beschreiben, miteinander kombiniert werden.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Geräte

Analysenwaage Explorer	Ohaus, MA, Bradford, USA
Autoklav Infection Control	Belimed GmbH, Mühldorf
Zellinkubator Heraeus	Heraeus, Hanau
Durchflußcytometer Canto II	Becton-Dickinson, Heidelberg
Durchflußcytometer LSR Fortessa II	Becton-Dickinson, Heidelberg
Zellsortierer, FACS-Aria II	Becton-Dickinson, Heidelberg
Eppendorfpipette 0,2-2,5µl	Eppendorf, Hamburg
Eppendorfpipette 1-10µl	Eppendorf, Hamburg
Eppendorfpipette 2-20µl	Eppendorf, Hamburg
Eppendorfpipette 20-200µl	Eppendorf, Hamburg
Eppendorfpipette 200-1000µl	Eppendorf, Hamburg
12-Kanal-Pipette 30-300µl	Biohit, Rosbach v. d. Höhe
12-Kanal-Pipette 1-10µl	Eppendorf, Hamburg
Verstellbare 8-Kanal-Pipette 30-300µl	Mettler Toledo, Giessen

elektronische 8-Kanal-Pipette 2-20µl	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Gefrierschrank -20°C	Bosch, München
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Hanau
Kühlschränke 4°C	Bosch, München
Mikrowelle	Bosch, München
Nanodrop Spectrophotometer	Thermo Fisher scientific, Wilmington, USA
pH-Meter PHM210	Radiometer, Copenhagen
Laufkammern	BioRad, München
Laufkammern	PeqLab, Erlangen
Power supply EPS301	Amersham, Straubing
Geldokumentationssystem	BioRad, München
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
37°C Inkubator Innova S2	New Brunswick, Wesseling-Berzdorf
37°C Schüttler	IKA, Heidelberg
T10-Basic Ultra Turrax	IKA, Heidelberg
Sterile Werkbank Heraeus HeraSafe	Heraeus, Hanau
IVC Mauskäfige	Tecniplast, Hohenpeißenberg

Heraeus Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, CH
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zählhilfe, Laboratory Counter	Becton-Dickinson, Heidelberg
Pipettus	IBS Integra Biosciences
Isofluran-Narkoseanlage	Eickemayer, Tuttlingen
Roche LightCycler LC 480 II	Roche, Basel, Schweiz
peqStar 2X Thermocycler	PeqLab, Erlangen
Tecan Absorbance Reader	Tecan, Crailsheim
LB 940 Mitra Microplate Reader	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Optisches Mikroskop CKX31	Olympus, Heidelberg
Eismaschine MF 26	Scotman Ice-System, Vernon
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg

Tab. 1: Verwendete Geräte und deren Hersteller

6.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalkanülen 0,4 x 12mm Sterican	Braun, Melsungen
Einmalkanülen 0,7 x 30mm Sterican	Braun, Melsungen
Einmalkanülen 0,8 x 40mm Sterican	Braun, Melsungen
Einmalspritzen 1/5/10/20 ml	Braun, Sterican
Eppendorfreaktionsgefäße 0,2ml/0,5ml/1ml/2ml	Eppendorf, Hamburg
FACS Röhrchen	Sarstedt, Nürnbrecht
FALCON-Röhrchen 15ml PP	Sarstedt, Nürnbrecht
FALCON-Röhrchen 50ml PP	Sarstedt, Nürnbrecht
Glaspipetten 5ml, 10ml, 25ml	Greiner, Nürtingen
Falcon Cell strainer 40µm	BD, Heidelberg
Nylongaze (30, 50 und 100µm)	Labomedic, Bonn
Parafilm	Labomedic, Bonn
Pipettenspitzen 0,2-10µl	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen 2-200µl	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen 200-1000µl	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen 30-300µl	Mettler Toledo, Giessen

Pipettenspitzen 1-30µl 384-Well	Thermo-Scientific, Wilmington, USA
6, 12, 24,96 Vertiefungsplatten (flach)	CorningCostar, Bodenheim
96-Vertiefungen-Rundbodenplatten	CorningCostar, Bodenheim
Plastik-Transferpipetten	CornigCostar, Bodenheim
Skalpellklingen	Rüttgers, Solingen
10cm Zellkulturschalen	Sarstedt, Nürnbrecht
20G Vasculon Plus Venenverweilkanüle	BD, Heidelberg
Wattestäbchen (8cm)	Wechselnd, Medizinbedarf, Zentrallager

Tab. 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller

6.1.3 Reagenzien

Tris	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Vancomycin	Ratiopharm, Ulm
Metronidazol	Ratiopharm, Ulm
Natrium-Azid	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Merck, Darmstadt
Expand High-Fidelity PCR-System dNTPack	Roche, Mannheim

Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Kollagenase D	Sigma-Aldrich, Darmstadt
DNAse I	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	PAA, Pasching, Österreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
CaliBRITE® APC-beads	BD, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Sigma, München
BSA Fraction V, low endotoxin cell culture grade (Rinderserumalbumin)	PAA, Darmstadt
RPMI 1640	Gibco, Paisley, UK
PBS für Zellkultur	Gibco, Paisley, UK
Hoechst-33358	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
o-Phenylendiamin (OPD)	Sigma, München
Paraformaldehyd	PAA, Darmstadt
Streptavidin-Fluoreszenzkonjugate	BD, Heidelberg

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, München
Sybr Safe DNA Gel Stain	Invitrogen, Karlsruhe
100bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruge
TriDye 1kb DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt
DMEM 4,5g/l D-Glucose	Gibco, Paisley, UK
Perm/Wash Buffer	BD, Heidelberg
Isofluran Forene 100%	Abbott, Wiesbaden
Privigen, human globuline IgG	CSL Behring, Marburg
Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran	Sigma-Aldrich, München
OneComp eBeads	Ebioscience, Frankfurt
SybrGreen PCR MasterMix	Applied Biosystems / Life Technologies, Karlsruhe
Primer	Life Technologies, Karlsruhe
iNOS RT-PCR Primer QuantiTect	Qiagen, Hilden
Roche complete Mini protease inhibitor	Roche, Mannheim

0.5µm Fluoresbrite Plein Microsphere beads (yellow green)	Polysciences, Eppelheim
Clodronate liposomes	ClodronateLiposomes, Amsterdam

Tab. 3: Verwendete Reagenzien und deren Hersteller

6.1.4 Antikörper

Antigen	**Klon**	**verw. Konjugate**	**Hersteller**	**Verdünnung**
CD11b	M1/70	APC	eBioscience, Frankfurt	1:400
CD11c	N418	BV605, BV421, APC	Biolegend, Fell	1:100-1:200
CD45	30-F11	BV421, PB, APC-Cy7	BD Biosciences, Heidelberg	1:200
CD64	X54-5/7.1	APC	BioLegend, Fell	1:200
CD115	M290	PE, APC	BD Biosciences, Heidelberg	1:200-1:400
F4/80	CI:A3-1	PE, FITC	Biolegend, Fell	1:200
Gr1	RB6-8C5	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences, Heidelberg	1:600
Ly6C	HK 1.4	PerCP-Cy5.5	eBioscience,	1:400-1:800

			Frankfurt	
MHC-II	M5/114.15.2	APC-Cy7, PE-Cy7, FITC	Biolegend, Fell	1:400
CD103	2E7	PE	Biolegend, Fell	1:200

Tab. 4: Verwendete Antikörper (Epitope und Klone), inkl. verwendeter Verdünnung, sowie dem Fluorochrom und deren Hersteller

6.1.5 Primer

Name	**Sequenz, 5'-3'**
HPRT	Vorwärts: GTCCCAGCGTCGTGATTAGCGAT Rückwärts: GGGCCACAATGTGATGGCCTCC
IFN-γ	Vorwärts: TCATTGAATGCTTGGCGCTG Rückwärts: AGGAACTGGCAAAAGGATGGT
iNOS	Quantitect Nos2 Primer (Qiagen, Hilden)
EGFP/IRF4_fw2	AGCTTGCCGTAGGTGGCATCG
IRF4_I2_2fw	CCACTCTCTGCTTCCCTGTC
TKproIRF4C1	CTTCCTCATCTCCGGGCCTTTCG
CD11c-Cre_fwd	ACTTGGCAGCTGTCTCCAAG
CD11c-Cre_rev	GCGAACATCTTCAGGTTCTG

Tab. 5: Verwendete Primer (Name und Sequenz 5'-3')

6.1.6 Kits

High capacity cDNA Reverse transcription Kit	Applied Biosystems / Life Technologies, Karlsruhe

NucleoSpin RNA XS	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Tissue	Macherey-Nagel, Düren
Mouse IL-12p70 ELISA Ready-Set-Go!	eBioscience, Frankfurt
Mouse IFN-γ ELISA Ready-Set-Go!	eBioscience, Frankfurt
Live/Dead Fixable dead cell stain	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 6: Verwendete Kits und deren Hersteller

6.1.7 Software

Office 2011 (Mac)	Microsoft
Illustrator CS15	Adobe Software Systems
FlowJo 8	TreeStar Inc.
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc.
Ensembl Browser	www.ensembl.org
Primer Blast	www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
FACS-Diva	BD Biosciences, Heidelberg
Magellan	Tecan, Crailsheim

Tab. 7: Verwendete Software und deren Hersteller bzw. Webseite

6.1.8 Statistische Analyse

Statistische Analysen wurden mit Prism 5 durchgeführt. Resultate werden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Unterschiede zwischen 2 Gruppen wurden mittels t-Test auf statistische Signifikanz getestet. Ein P-Wert kleiner als 0,05 wurde hierbei als signifikant (P<0,05 *, P<0,01 **, P<0,001***) angesehen. Wenn nötig wurde ein 1- oder 2-seitiger Test auf Varianz für alle anderen Daten durchgeführt. Die Anzahl an Experimenten und die Gruppengrößen sind in den Legenden der Abbildungen angegeben.

6.1.9 Mäuse

Mäuse wurden mehr als 10 Generationen auf C57BL/6 Hintergrund rückgekreuzt und im Alter von 8-14 Wochen verwendet. Die Haltung erfolgte unter SPF-Bedingungen in den Haltungseinrichtungen des Uniklinikums Bonn.

C57Bl/6 Inzuchtmäuse stammten aus einer eigenen Zucht, die ursprünglichen Zuchttiere wurden von Janvier, Saint-Berthevin Cedex, Frankreich bestellt.

Ccr2$^{-/-}$ *x Cx3cr1*$^{GFP/+}$ erhielten wir durch Kreuzung von *Ccr2*$^{-/-}$ [Kuziel et al. 1997] mit Cx3cr1$^{GFP/GFP}$ Mäusen [Jung et al. 2000]. Es wurden auch *Ccr2*$^{-/-}$ und *Cx3cr1*$^{GFP/+}$ Mäuse in den Versuchen eingesetzt, welche aus der Kreuzung von C57Bl/6 Mäusen mit *Cx3cr1*$^{GFP/GFP}$ Mäusen entstanden.

Cd11c-Cre$^{+/-}$ *x Irf4*^{flox} Mäuse [Persson et al. 2013] wurden freundlicherweise von William Agace bereitgestellt und mit *Cd11c-Cre*$^{-/-}$ *x Irf4*^{flox} Mäusen verkreuzt. *Cd11c-Cre*$^{-/-}$ *x Irf4*^{flox} Mäuse wurden als Kontrollen eingesetzt.

Knochenmark zur Generierung von *Cx3cr1-Cre*$^{+/-}$ *iDtr*^{flox} Knochenmarkschimären wurde freundlicherweise von Steffen Jung, Rehovot, Israel bereitgestellt. Hierbei wurden CD45.1 Mäuse als Empfänger verwendet.

6.2 Puffer und Lösungen

PBS:

1,15 g/l Na_2HPO_4

0,2 g/l KH_2PO_4

8 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

pH 7,2

TAE Puffer (50x):

2 M Tris

1 M NaAc

50 mM EDTA

pH 7,9 mit Essigsäure (96%) eingestellt

6x Ladepuffer:

0,25% Bromphenolblau

0,25% Xylencyanolblau

30% Glycerin

50 mM EDTA

Erythrozyten-Lyse-Puffer (RCB):

145mM NH_4Cl

100µM EDTA Dinatriumsalz

12mM $NaHCO_3$

in destilliertem Wasser, pH=7,3

Lagerung bei -20°C

FACS-Puffer:

0,1% FCS

0,01% NaN3

in 1x PBS

Lagerung bei 4°C.

FACS-Blockmedium:

FACS-Puffer

1:66 hIgG Privigen

Verdaumedium:

RPMI 1640

10% FCS

6mg/ml Penicillin und 10mg/ml Streptomycin

0,01% NaN3

2mg/ml Kollagenase

100µg/ml DNAse

FITC-Dextran Stammlösung:

PBS

50mg/ml FITC-Dextran

6.3 Methoden

6.3.1 Gastrointestinale Manipulation des Dünn- oder Dickdarms von Mäusen

Zur Erzeugung eines POI wurden Mäuse einer OP des Dünn- oder Dickdarms unterzogen. Hierzu wurden die Mäuse mittels des Anästhetikums Isofluran betäubt (2-3% Isofluran bei einem Sauerstoffpartialdruck von 2% paO_2) und auf einer warmen Heizmatte unter weiterer Isofluranzufuhr platziert. Vor Beginn der OP wurde die korrekte Narkose der Maus mittels Palpation der Pfote überprüft, zum Ende der Operation wurde die eingestellte Isofluranmenge reduziert, um das Aufwachen der Maus zu erleichtern. Bauchwand und Peritoneum wurden durch einen Schnitt mit der Schere entlang der *Linia alba* eröffnet.

Im Rahmen der Dünndarmmanipulation wurde ein sichtbares Stück des Jejunums mit einer Pinzette angehoben, und mit Hilfe eines mit PBS angefeuchteten Wattestäbchens wurde der Rest des Dünndarms unter vorsichtigen, streichenden Bewegungen aus dem Bauchraum entfernt. Ohne, im Rahmen dieser Prozedur, Magen oder Dickdarm zu berühren, wurde der Dünndarm dann auf einem Stück mit PBS angefeuchtetem, sterilem Papiertuch platziert. Anschließend wurde unter sanftem Druck, mit Hilfe zweier angefeuchteter Wattestäbchen, der Inhalt des Darms von *oral* nach *distal* disloziert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das Mesenterium nicht beschädigt wird.

Zur Manipulation des Dickdarms wurde mit Hilfe einer Pinzette das *Caecum* angehoben und wiederum mit Hilfe eines angefeuchteten Wattestäbchens *Caecum* und *Colon* aus dem Bauchraum entfernt. Anschließend wurde das Colon wiederum mit zwei feuchten Wattestäbchen, wie oben beschrieben, manipuliert. Im Dickdarm wurde diese Prozedur ein zweites Mal wiederholt.

Im weiteren Verlauf der Operation wurden sowohl Dick- als auch Dünndarm unter Zuhilfenahme von Wattestäbchen wieder im Bauchraum platziert und die Inzision des Peritoneums und der Bauchwand vernäht.

Schein-behandelte Mäuse (Sham) wurden unter Narkose eröffnet und vernäht.

6.3.2 Messung der Dünndarmmotilität mit Hilfe des FITC-Dextran Transit

Zur Bestimmung der Dünndarmmotilität wurde ein FITC-Dextran Transit durchgeführt, der 24h nach intestinaler Manipulation erfolgte. Hierzu wurden die operierten Mäuse

mit 100µl FITC-Dextran Lösung mit Hilfe einer Schlundsonde gefüttert, 90min später wurde der gesamte gastrointestinale Trakt inklusive des Magens entfernt. Das Mesenterium wurde, ohne den Darminhalt zu bewegen, aufgetrennt und der Darm auf einer mit Alufolie belegten Platte ausgebreitet. Anschließend wurden die Gesamtlängen des Dünn- und des Dickdarms, ohne Magen und *Caecum,* bestimmt. Daraufhin wurde der Dünndarm in 10, der Dickdarm in 3 gleichlange Teile geschnitten und die 15 Gesamtsegmente (inkl. Magen und *Caecum*) in vorbereitete 1,5ml Reaktionsgefäße mit 1ml PBS überführt.

Magen und *Caecum* wurden mit Hilfe einer Präparationsschere in der PBS Lösung zerkleinert, die restlichen Darmsegmente ausgespült und entfernt. Anschließend wurden alle Reaktionsgefäße bei 13.000rpm für 10min zentrifugiert und 100µl des Überstandes in eine 96-Vertiefungsplatte überführt. Mit Hilfe eines Tecan-Readers wurde die Intensität des FITC-Signals im Überstand jedes Darmsegments bestimmt, um Rückschlüsse auf den Transport des Darminhalts in 90min zu erhalten. Hierzu wurde der prozentuale Anteil der FITC-Intensität in jedem Segment, bezogen auf die Gesamtintensität im Gastrointestinaltrakt einer Maus, bestimmt (%FITC im Segment = FITC-Segment / (Σ FITC-Segmente)* 100). Zur Bestimmung des geometrischen Zentrums der FITC-Intensität wurde der bereits bestimmte prozentuale Anteil dieses Segments mit der jeweiligen Segmentnummer (1 = Magen, 15 = letztes Segment des Dickdarms) multipliziert und für alle Segmente aufaddiert. Anschließend wurde durch 100 dividiert ((Σ (%FITC im Segment * Segmentnummer))/100).

6.3.3 Bestimmung der Dickdarmmotilität

Zur Bestimmung der Dickdarmmotilität wurden die Mäuse 24h nach erfolgter intestinaler Manipulation mit Hilfe von Isofluran (2-3% Isofluran, 2% paO2) betäubt. Unter Benutzung eines abgeschmolzenen Glasstabs wurde eine Glaskugel, mit einem Durchmesser von 2mm, 2,5cm tief über das Rektum inokuliert.

Danach wurde die Narkose beendet und die Zeit nach Erholung von der Narkose bis zum Ausscheiden der Kugel vermessen.

6.3.4 Isolation der *Muscularis externa* des Dünn- und des Dickdarms

Zur Trennung von *Muscularis externa* und *Mucosa* wurde der Dünn- oder Dickdarm, in max. 10cm langen Abschnitten, auf einen Glassstab aufgezogen. Danach wurden Reste

des *Mesenteriums* und die *Peyer-plaques* mit Hilfe einer Pinzette entfernt. Die *Muscularis* des Dickdarms wurde zuerst mit einer stumpfen Schere angeschnitten. Dann wurde unter drehenden und rollenden Bewegungen mit einem Wattestäbchen die *Muscularis* von der *Mucosa* getrennt und anschließend vom Wattestäbchen in kaltes PBS überführt. Vor der weiteren Verwendung wurde sie in einem neuen 1,5ml Reaktionsgefäß mit PBS verwogen.

6.3.5 Gewinnung von Zellen zur durchflußzytometrischen Analyse aus der *Muscularis externa*

Die verwogene *Muscularis externa* wurde in Verdaumedium in eine 6-Well-Platte überführt und bei 37°C für 30min inkubiert. Danach wurde das Gewebe, durch Auf- und Abpipettieren mit Hilfe einer 1ml-Spitze, mechanisch dispergiert. Anschließend folgte eine weitere Inkubation für 15min. Daraufhin wurden die Zellen 2 mal mit kaltem FACS-Puffer gewaschen und durch ein 100µm Nylongewebe filtriert.

6.3.6 Gewinnung von Zellen aus dem peripheren Blut von Versuchsmäusen

Die Mäuse wurden durch CO_2-Begasung getötet. Der Brustkorb wurde mit Hilfe einer Schere geöffnet und venöses Blut wurde durch Herzpunktion mit einer 26G-Kanüle direkt aus der anatomisch rechten Herzkammer entnommen. Anschließend wurde das Blut in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt, das 10µl 0,5M EDTA-Lösung enthielt. Dann wurde in FACS-Gefäßen 2 mal mit 2ml RCB-Puffer eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt und 2 mal mit kaltem FACS-Puffer gewaschen, sowie durch ein 100µm Nylongewebe filtriert.

6.3.7 Bestimmung der Zellkonzentration in Zellsuspensionen

10µl der zu zählenden Zellsuspension wurden in 10µl 1%iger Essigsäure und anschließend in 180µl Trypanblau verdünnt, um Erythrozyten zu lysieren und tote Zellen erkennen zu können. 10µl dieser Suspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Hier wurden 4 Quadrate ausgezählt. Durch Trypanblau blau gefärbte, tote Zellen wurden nicht beachtet.

Um die Zellzahl pro Milliliter zu bestimmen, wurde die gezählte Zellzahl mit dem Faktor 50.000 multipliziert, eine 1:20 Verdünnung in Trypanblau vorausgesetzt.

6.3.8 Gewinnung von Knochenmark aus Mäusen

Zur Gewinnung von Knochenmark wurde der Bauchraum der Maus, deren Knochenmark gewünscht war, eröffnet und das Oberschenkelgelenk durch Ziehen luxiert. Danach wurden die noch geschlossenen Knochen des Beines (Femur und Tibia) durch Schnitte oberhalb des Oberschenkel- und des Fußgelenks entnommen. Die entnommenen Knochen wurden bis zum Abschluss der Prozedur auf Eis in PBS gelagert. Die weitere Aufreinigung erfolgte steril unter der Zellkulturbank.

Hier wurden die Knochen durch Abschneiden beider Gelenke eröffnet und mit frischem PBS mit Hilfe einer 27G-Kanüle ausgespült, bis keine Rotfärbung der Knochen mehr zu erkennen war. Die Suspension wurde durch Auf- und Abziehen mit einer 20G-Kanüle weiter suspendiert, danach wurde durch ein 40µm-Nylonnetz filtriert. Abschließend wurde die Knochenmarkssuspension pelletiert (600g, 10m, 4°C).

6.3.9 Generierung von Knochenmarkschimären

Mäuse wurden mit Ketamin (120mg/kg) + Xylazin (16mg/kg) mittels intraperitonaler Gabe betäubt und nach erfolgreich induziertem Schlaf mit 9Gy letal bestrahlt. 8h nach Bestrahlung wurden 5 x 10^6 Knochenmarkszellen transferiert. Experimente wurden 8 Wochen nach der Bestrahlung durchgeführt.

6.3.10 Depletion von Blutmonozyten und Markierung von Blutmonozyten

Blutmonozyten wurden durch die intravenöse Gabe von 200µl Clodronatliposomen 12h vor der Manipulation, bei der Manipulation und 6h nach der Manipulation depletiert.

In der Kontrollgruppe erfolgte eine Gabe von 200µl PBS.

Für die Markierung von $Ly6C^+$ Blutmonozyten wurden einmal Clodronatliposomen gegeben, 16-18h später wurden 250µl fluoreszente Beads 24h vor IM (YG Microspheres, Fluoresbrite) gegeben. $Ly6C^-$ Blutmonozyten wurden durch die Gabe von 250µl Beads 24h vor IM markiert.

6.3.11 Depletion in DTR-Mäusen

Zur Depletion von Zellen in iDTR-Mäusen wurden 10ng DT 12h vor der Manipulation intravenös gegeben.

In der Kontrollgruppe erfolgte eine Gabe von 100µl PBS.

6.3.12 Antibiotika-Behandlung von Mäusen

Zur Antibiotika-Behandlung wurde das Trinkwasser der Mäuse für 4-5 Wochen mit 1g/L Streptomycin, Metronidazol, Vancomycin und Ampicillin versetzt. Die Wasserflaschen wurden mit Alufolie vor Licht geschützt und alle 4 Tage gewechselt.

6.3.13 Durchflußzytometrische Analyse aufgereinigter Zellpopulationen

Die zu analysierenden Zellen wurden entweder in FACS-Röhrchen oder in 96-Well-Platten gefärbt. Vor der Zugabe von Flourochrom-gekoppelten Antikörpern wurden die Zellen pelletiert (Heraeus Multifuge 3 S-R, 5min bei 1200rpm) und in 100µl (FACS-Röhrchen) oder 50µl (96-Well-Platte) Blockmedium resuspendiert. Die Suspension wurde für mindestens 15min bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen über den Fc-Rezeptor zu minimieren. Anschließend wurden die Zellen mit 2ml/200µl FACS-Puffer gewaschen, in insgesamt 100µl/50µl FACS-Puffer resuspendiert und mit der vorher austitrierten Menge an Antikörper für 15min bei 4°C inkubiert. Nach 15min wurden die Zellen abermals mit FACS-Puffer gewaschen.

Zur Lebend-Tod-Unterscheidung wurde zu jeder Probe Hoechst 33258 in einer Konzentration von 0,5µg/ml hinzugegeben. Zur Ermittlung der absoluten Zellzahlen wurden APC-Beads einer definierten Anzahl hinzugefügt.

Die Proben wurden im Durchflußzytometer (BD LSR FortessaII, Zytometerkonfiguration: http://131.220.23.170/mediawiki/index.php/LSR_Fortessa) analysiert und mittels der Software Flowjo von Tree Star Inc. ausgewertet. Zellzahlen wurden mit Hilfe der zugefügten Beads und über das verwogene Gewicht/erlangte Volumen der Organe normalisiert.

6.3.14 IL-12p70 ELISA Analyse der *Muscularis externa*

Die *Muscularis externa* wurde 60min nach der Operation gewonnen und, wie oben beschrieben, gewogen. Anschließend wurde sie in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt, in welches 1ml Protease-Inhibtor (Roche, Mannheim, in PBS nach Herstelleranleitung) vorgelegt war. Dann wurde das Gewebe mit einem Ultra-Turrax (IKA, Heidelberg) 1min zerkleinert und anschließend bei 13.000rpm 10min kalt zentrifugiert. Der Überstand wurde im IL-12p70 ELISA (eBiosciences, Frankfurt) nach Herstelleranleitung analysiert, die ELISA-Platte auf einem Tecan-Reader ausgewertet. Die Proteinkonzentration wurde auf ein Gewicht von 100mg *Muscularis* normalisiert.

6.3.15 IFN-γ ELISA Analyse der *Muscularis externa*

Die *Muscularis externa* wurde 24h nach der Operation gewonnen und, wie oben beschrieben, gewogen. Anschließend wurde sie in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt und der Überstand, wie oben beschrieben (IL-12p70 ELISA), gewonnen. Der Überstand wurde im IFN-γ ELISA (eBiosciences, Frankfurt) nach Herstelleranleitung analysiert, die ELISA-Platte auf einem Tecan-Reader ausgewertet. Die Proteinkonzentration wurde auf ein Gewicht von 100mg *Muscularis* normalisiert.

6.3.16 Gewinnung von RNA aus Gewebe

Zur Gewinnung von RNA wurde die *Muscularis externa,* wie oben beschrieben, 24h nach der Operation gewonnen, jedoch in einem trockenen 1,5ml Eppendorf-Gefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es wurde nicht mehr als 30mg Gewebe in einem Eppendorf-Gefäß eingefroren.

Anschließend wurde 600µl Lyse-Puffer RA1 (NucleoSpin RNA II Kit, Macherey&Nagel, Düren) mit 20mM TCEP supplementiert und auf das noch gefrorene Gewebe gegeben. Mit einem Pistill für Eppendorfgefäße wurde das Gewebe im Eppendorf-Gefäß mechanisch zerstört und mit der RNA-Aufreinigung nach Herstelleranleitung fortgefahren.

Nach der RNA-Aufreinigung wurde direkt mit der cDNA-Synthese fortgefahren.

6.3.17 Gewinnung von RNA aus sortierten Zellen

Die Zellen wurden für die Sortierung wie zur Durchflußzytometrie (sh.o.) vorbereitet und kurz vor der Sortierung durch ein 30µm Gewebe filtriert. Im Rahmen der Sortierung wurde auf ein stringentes Gating und einen Ausschluss von toten Zellen mittels Hoechst-33358 sowie Zelldubletten geachtet.

Zur Gewinnung von RNA aus sortierten Zellen wurde mit dem NucleoSpin RNA XS Kit gearbeitet (Macherey&Nagel, Düren). Der Lyse-Puffer wurde mit 20mM TCEP supplementiert und für die Zellsortierung mittels Durchflußzytometrie am BD FACS Aria II wurden 100µl in ein Eppendorf-Gefäß vorgelegt. Je nach sortierter Zellmenge wurde direkt nach der Sortierung zusätzlicher Lyse-Puffer zugegeben (pro 1000 Zellen 1µl Lyse-Puffer) und die sortierten und lysierten Zellen bis zum nächsten Tag bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurde die RNA auf Eis aufgetaut und anschließend nach Herstelleranleitung aufgereinigt. Je nach sortierter Zellanzahl wurden die Puffermengen

der Aufreinigung, entsprechend im Verhältnis zum eingesetzten Volumen des Lysepuffers, angepasst. Es wurde mit 20µl RNAse freiem Wasser eluiert.

Nach der RNA-Aufreinigung wurde direkt mit der cDNA-Synthese fortgefahren.

6.3.18 cDNA-Synthese aus RNA

Mit 1µl der Basis-Lösung RNA wurden mit einem NanoDrop Reinheit und Konzentration der RNA bestimmt. Die RNA aus dem Gewebe wurde auf eine Konzentration von 150ng/µl verdünnt und anschließend 10µl in der cDNA-Synthese eingesetzt. RNA aus der Zellsortierung wurde nicht verdünnt und 10µl direkt in der cDNA-Synthese eingesetzt, sofern die Konzentration nicht über 150ng/µl lag.

Zur cDNA-Synthese wurde nach Herstelleranleitung (High capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Darmstadt) mit einem Gesamtvolumen der cDNA-Synthese von 20µl unter Einsatz von 1µl RNAse Inhibitor fortgefahren.

6.3.19 Quantitative RT-PCR aus cDNA

Genexpression wurde mit Hilfe einer quantitativen Real Time PCR (qRT-PCR) bestimmt. Hier wurden für iNOS der *Nos2*-Quantitect Primer (Qiagen, Hilden) und für IFN-γ und HPRT ein eigenes Primerpaar eingesetzt. Die qRT-PCR wurde nach Herstelleranleitung mit dem SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) auf einem Roche LightCycler nach Herstelleranleitung durchgeführt. Von jeder Probe wurden Triplikate durchgeführt, die cDNA wurde bei Gewebeproben 1:5, bei sortierten Proben 1:2 verdünnt. Dann wurden jeweils 2µl pro Vertiefung in einer 384-Vertiefungsplatte in einem Gesamtreaktionsvolumen von 10µl eingesetzt.

Die PCR wurde nach Herstelleranleitung des Sybr-Green MasterMix mit 45 Amplifikationszyklen ausgeführt. Nach der eigentlichen PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt und Proben mit abweichenden oder 2 Schmelzpunkten wurden ausgeschlossen.

6.3.20 Gewinnung von genomischer DNA zur Überprüfung des Genotyps von *Cd11c-Cre x Irf4^{flox}* Mäusen

Zur Gewinnung genomischer DNA wurden die Schwanzspitzen von Mäusen genommen und die Mäuse mittels Ohrmarken markiert. Die Schwanzspitzen wurden entweder eingefroren oder direkt mit Hilfe des NucleoSpin Tissue Kits (Macherey&Nagel, Düren)

aufgereinigt, da eine traditionelle Aufreinigung mittels alkalischer Lyse der Schwanzspitzen keinen PCR-Erfolg im *Irf4* Lokus brachte.

Die Aufreinigung wurde nach Herstellerangabe für Schwanzspitzen durchgeführt und anschließend die DNA in 50µl destilliertem Wasser eluiert.

6.3.21 PCR auf genomische DNA zur Überprüfung des Genotyps von *Cd11c-Cre x Irf4^{flox}* Mäusen

Zur Verwendung von *Cd11c-Cre x Irf4^{flox}* Mäusen musste sowohl der Genotyp des *Cd11c* Lokus (Cre^{+} oder Cre^{-}) als auch des *Irf4* Lokus überprüft werden (flox^{+} oder flox^{-}). Ein Mastermix im folgenden Verhältnis wurde zur Überprüfung des *Irf4* Lokus angesetzt:

Reagenz	Volumen in µl (1 PCR-Ansatz)
Destilliertes Wasser	17,3
PCR-Puffer Taq-Polymerase 10x	2,5
DMSO	0,6
$MgCl_2$ 25mM	1,5
dNTPs 10mM	0,6
Primer EGFP/IRF4_fw2 20µM	0,5
Primer IRF4_I2_2fw 20µM	0,5
Primer TKproIRF4C1 20µM	0,5
Taq-Polymerase	0,15
DNA-Template	2

Tab. 8: PCR-Ansatz zur Genotypisierung im *Irf4*-Lokus

Der Ansatz wurde mit folgendem PCR-Programm amplifiziert:

Temperatur / Zeit	Wiederholungen
96°C / 2min	1X
95°C / 20s 58°C / 20s 72°C / 20s	32X
72°C / 7min	1X
10°C / unendlich	1X

Tab. 9: PCR-Programm zur Genotypisierung im *Irf4*-Lokus

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese auf einem 2%igen Agarosegel überprüft. Eine 180bp-Bande repräsentiert hierbei den Flox-Lokus, eine 220bp-Bande den Delta-Lokus.

Zur Überprüfung des *Cd11c* Lokus wurde folgender PCR-Mastermix eingesetzt:

Reagenz	Volumen in µl (1 PCR-Ansatz)
Destilliertes Wasser	18,75
PCR-Puffer Taq-Polymerase mit $MgCl_2$ 10x	2,5
dNTPs 10mM	0,6
Primer CD11c-Cre_for 20µM	0,5
Primer CD11c-Cre_rev 20µM	0,5
Taq Polymerase	0,15
DNA-Template	2

Tab. 10: PCR-Ansatz zur Genotypisierung im *Cd11c*-Lokus

Anschließend wurde folgendes PCR-Programm durchgeführt:

Temperatur / Zeit	Wiederholungen
96°C / 2min	1X
95°C / 20s 57°C / 20s 72°C / 20 s	35X
72°C / 7min	1X
10°C / unendlich	1X

Tab. 11: PCR-Programm zur Genotypisierung im *Cd11c*-Lokus

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese auf einem 2%igen Agarosegel überprüft. Eine 300bp-Bande repräsentiert hierbei den vorhandene Cre im *Cd11c* Lokus.

6.3.22 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden 1,5-2%ige Agarosegele hergestellt. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose abgewogen und mit dem entsprechenden Volumen 1x TAE-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde in der Mikrowelle aufgekocht bis eine klare Lösung entstand. Anschließend wurde im Verhältnis 1:1000 Sybr Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben. Die Proben wurden mit 6x-Ladepuffer verdünnt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde 1 Längenstandard (5µl) aufgetragen (100bp DNA Leiter (Invitrogen, Karlsruhe)).

Die Gelelektrophorese wurde bei 80V für einen Zeitraum von 60-120min durchgeführt. Anschließend wurden die Gele mit Hilfe des Geldokumentationssystems der Firma BioRad (München) fotografiert. Hierbei wird die DNA durch UV-Anregung des interkalierten Sybr Safe sichtbar.

7 Ergebnisse

7.1 Nach Manipulation des Dünndarms kommt es zur Immigration IRF4-abhängiger CD103$^+$CD11b$^+$ dendritischer Zellen

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass CD103$^+$CD11b$^+$ DZ nach intestinaler Manipulation des Dünndarms (SIM) IL-12 produzieren. Außerdem wurde eine Beteiligung von IL-12 an der Bildung eines POI demonstriert [Engel et al. 2010]. Allerdings konnte in den bisher vorhandenen Studien die Beteiligung von CD103$^+$CD11b$^+$ DZ am POI nicht direkt nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb mit der Untersuchung dieser DZ-Population begonnen.

Hierzu wurden am Dünndarm intestinal manipulierte Mäuse (SIM) mit scheinoperierten Mäusen (Sham) durchflusszytometrisch verglichen, indem die *Muscularis externa*, vom Rest des Darms getrennt (Kap. 6.3.4), aufgereinigt und gefärbt wurde.

Anschließend wurden in einer durchflusszytometrischen Analyse die Zellen zuerst nach ihrer Größe und Granularität selektiert, darauffolgend wurden die CD11c$^+$MHCII$^+$ Zellen sowohl auf CD103$^+$CD11b$^+$ als auch auf CD103$^+$CD11b$^-$ DZ untersucht (Abb. 10 A). Es zeigte sich, dass es nach SIM zur Einwanderung von MHCII$^+$CD103$^+$CD11b$^+$ DZ und einer sehr geringen Anzahl von MHCII$^+$CD103$^+$CD11b$^-$ DZ kommt (Abb. 10 A, B, C, D).

Um die Notwendigkeit dieser Zellen für den POI nachzuweisen, wurde eine Methode zur genetischen Depletion dieser Zellen gesucht. Frühere Studien [Persson et al. 2013] hatten gezeigt, dass CD103$^+$CD11b$^+$ DZ in den mesenterischen Lymphknoten und der *Lamina propria* von *Cd11c-Cre$^+$Irf4^{flox}* (*Cd11c-Cre$^+$*) Mäusen, denen durch genetische Rekombination der *Irf4* Lokus fehlt, abwesend sind. Wir verglichen daher durchflusszytometrisch die *Muscularis externa* von SIM und Sham Mäusen dieses Genotyps. Als Kontrolle wurden *Cd11c-Cre$^-$Irf4^{flox}* Mäuse (*Cd11c-Cre$^-$*) verwendet, die einen intakten *Irf4* Lokus besitzen.

In der Tat zeigte sich ein signifikantes Fehlen von CD103$^+$CD11b$^+$ DZ in *Cd11c-Cre$^+$* Mäusen, während es in *Cd11c-Cre$^-$* Mäusen zu einem Influx dieser DZ nach SIM kam (Abb. 10 B, C). Die kleine Population CD103$^+$CD11b$^-$ DZ hingegen war in *Cd11c-Cre$^+$* Mäusen nicht signifikant beeinflusst (Abb. 10 D).

In der *Lamina propria* (LP) des Mäusedarms existiert außerdem eine Population inflammatorischer DZ, welche den Marker CX_3CR1 exprimiert, aber im Unterschied zu MPs nicht CD64 positiv ist. In der *Muscularis externa* hingegen konnte nach SIM diese Population nicht nachgewiesen werden, alle CX_3CR1^+ Zellen exprimierten auch CD64 (Abb. 10 E).

Zusammengefasst zeigen diese Experimente einen Influx von $CD103^+CD11b^+$ DZ nach SIM auf, während $CD103^+CD11b^-$ DZ nur sehr gering und $CX_3CR1^+CD64^-$ DZ nicht vertreten sind. Die Anwesenheit von $CD103^+CD11b^+$ DZ ist außerdem von IRF4 abhängig [Pohl et al. 2017].

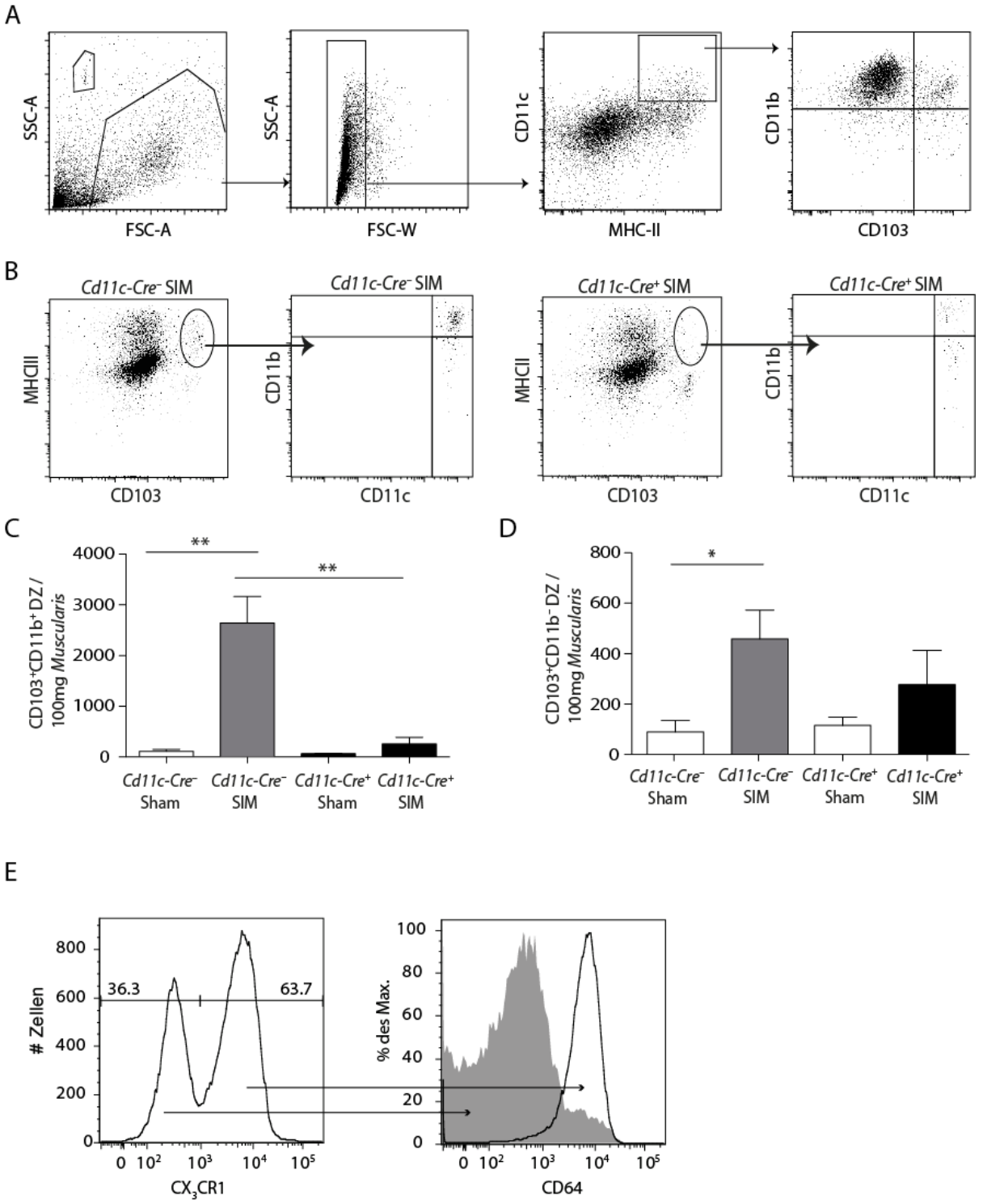

Abb. 10: CD103⁺CD11b⁺ DZ wandern nach intestinaler Manipulation des Dünndarms (SIM) ein und sind von IRF4 abhängig. (A, B) Gatingschema zur durchflusszytometrischen Analyse der *Muscularis externa* 24h nach SIM in C57Bl/6 (A) oder *Cd11c-Cre⁺Irf4^{flox} (Cd11c-Cre⁺)/Cd11c-Cre⁻Irf4^{flox} (Cd11c-Cre⁻)* Mäusen (B). (C, D) Durchflusszytometrisch ermittelte Anzahl von CD103⁺CD11b⁺ DZ (C) bzw. CD103⁺CD11b⁻ DZ (D) 24h nach Sham oder SIM in *Cd11c-Cre⁺* oder *Cd11c-Cre⁻* Mäusen. Vorgegatet auf Hoechst⁻CD45⁺CD11c⁺MHCII⁺ (SIM n=8, Sham n=5). (E) Durchflusszytometrische Analyse der CD64-Expression von CX_3CR1^+ (Linie) bzw. CX_3CR1^- (grau hinterlegt) Zellen vorgegatet auf Hoechst⁻CD45⁺CD11c⁺MHCII⁺. Resultate sind dargestellt als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts. *p<0,05; **p<0,01. Teilergebnisse dieser Abbildung sind ebenfalls in der angeschlossenen Publikation veröffentlicht [Pohl et al. 2017].

7.2 Der Postoperative Ileus hängt von CD103$^+$CD11b$^+$ dendritischen Zellen ab

Um festzustellen, ob eine funktionale Beteiligung CD103$^+$CD11b$^+$ DZ am POI vorliegt, wurde ein jejunaler Transit zur Messung der Peristaltik in *Cd11c-Cre$^+$Irf4^{flox}* (*Cd11c-Cre$^+$*) Mäusen mit *Cd11c-Cre$^-$Irf4^{flox}* (*Cd11c-Cre$^-$*) Mäusen als Kontrollgruppe durchgeführt. Kurz beschrieben, wurden hierzu Mäuse 24h nach der Operation mit einer FITC-Dextran Lösung gefüttert, 90min später wurde das anteilige FITC-Signal in einzelnen Dünn- und Dickdarmsegmenten bestimmt (sh. auch Kap. 6.3.2). Als zusätzliche Kontrollgruppe wurden scheinoperierte Mäuse eingesetzt. Die numerische Präsentation erfolgte durch Berechnung des geometrischen Zentrums des FITC-Signals (u.a. Abb. 11B). Zur Untersuchung der Dickdarmmotilität wurde eine Glaskugel retrograd eingeführt und die Exkretionszeit vermessen (sh. Kap. 6.3.3).

In der Tat zeigte sich in beiden Untersuchungen eine signifikante Verbesserung der Peristaltik nach POI in *Cd11c-Cre$^+$* Mäusen verglichen mit *Cd11c-Cre$^-$* Mäusen (Abb. 11A, B, C). In scheinoperierten Mäusen war hingegen zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied erkennbar.

Dies zeigt eine Beteiligung CD103$^+$CD11b$^+$ DZ am POI auf, allerdings wird in der Literatur auch auf eine Reduktion CD103$^+$CD11b$^-$ DZ in der LP von *Cd11c-Cre$^+$Irf4^{flox}* hingewiesen [Persson et al. 2013]. Zwar ist in der *Muscularis externa* diese Population nur sehr gering vertreten und keine Reduktion erkennbar (Abb. 10 D), eine Beteiligung dieser Zellen am POI sollte aber trotzdem untersucht und gegebenenfalls ausgeschlossen werden. Hierfür wurden *Xcr1-DTR* Mäuse mit *Diphteria Toxin* (DT) behandelt und anschließend wurde eine Reduktion dieser DZ nach SIM durchflusszytometrisch nachgewiesen (Abb. 11D). Die darauffolgend durchgeführten Transitexperimente zeigten keine Veränderung der Dünndarmmotilität (Abb. 11E) in DT behandelten Mäusen. Eine Beteiligung dieser DZ an der Entstehung eines POI ist somit sehr unwahrscheinlich.

Die beschriebenen Experimente zeigen somit auf, dass IRF4 abhängige CD103$^+$CD11b$^+$ DZ essentiell zur Pathologie eines POI beitragen, CD103$^+$CD11b$^-$ DZ hingegen nicht daran beteiligt sind [Pohl et al. 2017].

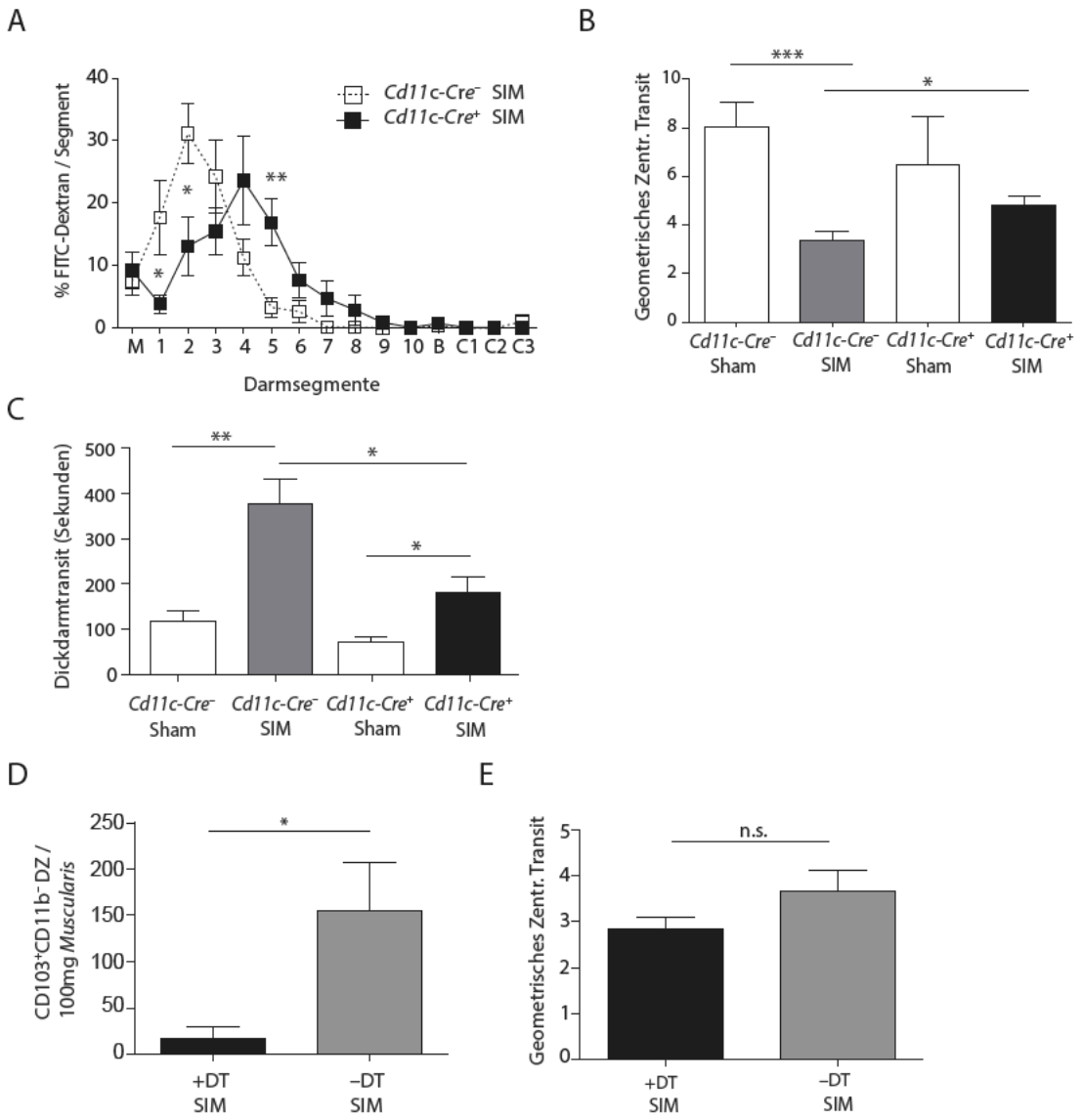

Abb. 11: Der POI hängt von CD103⁺CD11b⁺ DZ ab. (A-C) Analyse des Dünndarm- (A,B) und des Dickdarmtransits (C) in *Cd11c-Cre⁺* und *Cd11c-Cre⁻* Mäusen 24h nach SIM (n=8) oder Sham (n=4). M = Magen; 1-10 = Dünndarmsegmente; B = Blinddarm; C1-3 = Kolonsegmente. (D-E) Durchflusszytometrisch ermittelte Anzahl CD103⁺CD11b⁻ DZ (D) und geometrisches Zentrum des Dünndarmtransit (E) in 12h vor SIM depletierten (+DT) und undepletierten (-DT) *Xcr1-DTR* Mäusen 24h nach SIM (n=3-4 pro Gruppe). (D) ist vorgegatet auf Hoechst⁻ CD45⁺CD11c⁺MHCII⁺. Resultate sind dargestellt als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. Teilergebnisse dieser Abbildung sind ebenfalls in der angeschlossenen Publikation veröffentlicht [Pohl et al. 2017].

7.3 iNOS von Makrophagen hängt von CD103$^+$CD11b$^+$ dendritischen Zellen ab

Wesentlich zur Paralyse der Darmmotorik im Rahmen des POI ist die Freisetzung von NO durch MPs, produziert durch das Enzym iNOS (sh. Kap. 4.4.3). Die beim Fehlen von CD103$^+$CD11b$^+$ DZ festzustellende Verminderung des POI könnte somit entweder an einer Verminderung der Anzahl an MPs oder an einer Verminderung der NO-Produktion durch diese MPs liegen.

Wir untersuchten daher durchflusszytometrisch die Anzahl an MPs (Abb. 12A,B), indem wir auf Hoechst$^-$CD45$^+$F4/80$^+$CD64$^+$ Zellen selektierten. Hierbei war ein deutlicher und signifikanter Anstieg an MPs nach der Manipulation des Dünndarms feststellbar. Dieser Anstieg war in *Cd11c-Cre*$^+$ Mäusen beim Fehlen von CD103$^+$CD11b$^+$ DZ jedoch nicht vermindert und erklärte somit auch nicht den verminderten POI.

Als zweite Hypothese untersuchten wir daher die iNOS-Produktion durch diese MPs. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch nach SIM oder Sham Manipulation in *Cd11c-Cre*$^+$ oder *Cd11c-Cre*$^-$ Mäusen sortiert und mittels qRT-PCR auf Expression der iNOS-mRNA (*Nos2*) untersucht. In der Tat zeigte sich eine deutliche Erhöhung der iNOS-Produktion in SIM-Mäusen gegenüber Sham-Mäusen (Abb. 12C). Diese Erhöhung blieb jedoch in *Cd11c-Cre*$^+$ Mäusen aus. Die iNOS Expression in MPs nach SIM ist somit in Abwesenheit von CD103$^+$CD11b$^+$ DZ vermindert.

Dies deutet somit auf eine Aktivierung von MPs zur iNOS Expression, und damit NO Produktion, durch CD103$^+$CD11b$^+$ DZ hin. Infolgedessen kommt es zu einer Verringerung der Darmmotilität und somit zu einem POI [Pohl et al. 2017].

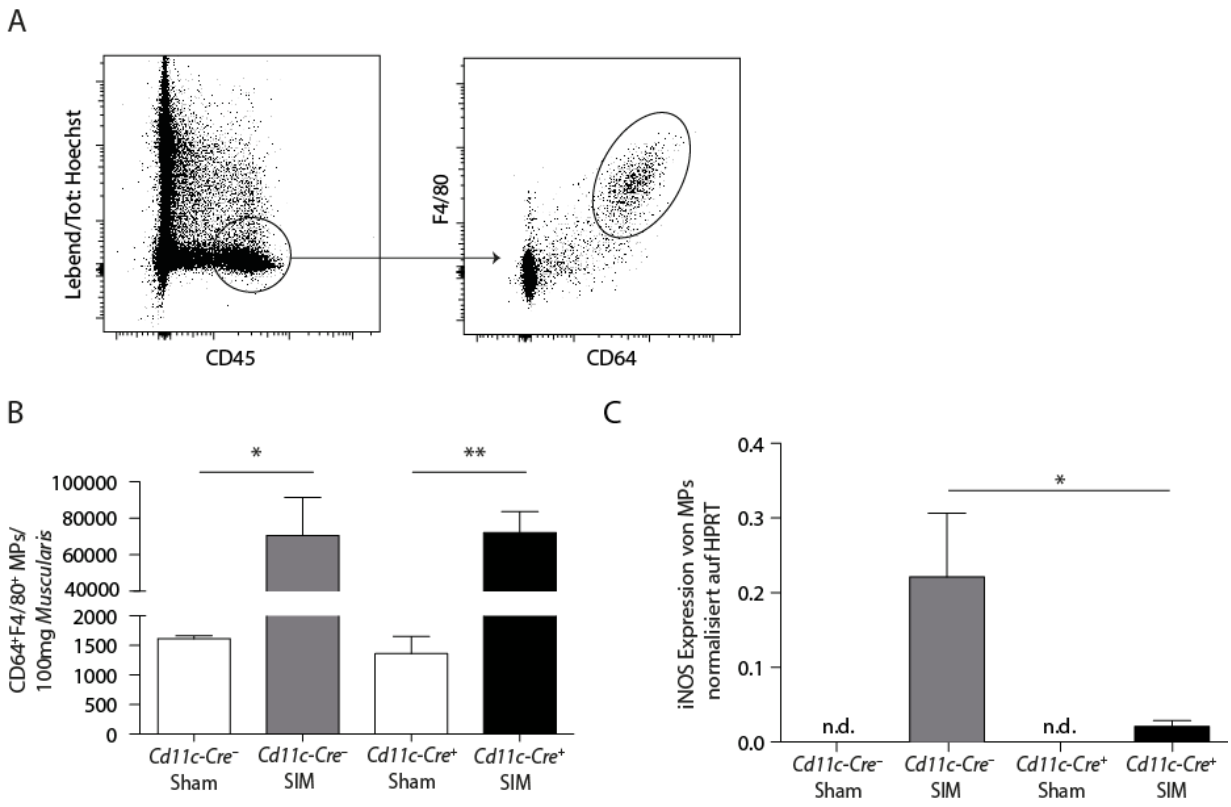

Abb. 12: Die iNOS-Produktion von MPs ist reduziert in *Cd11c-Cre⁺* Mäusen. (A-C) (A) Gating Schema zur Analyse (B) und Sortierung (C) von *Muscularis* MPs 24h nach Dünndarmmanipulation (SIM) in einer *Cd11c-Cre⁻Irf4^{flox}* (*Cd11c-Cre⁻*) Maus. (B) Durchflusszytometrisch ermittelte Anzahl an CD64⁺F4/80⁺ MPs 24h nach Sham oder SIM in *Cd11c-Cre⁺Irf4^{flox}* (*Cd11c-Cre⁺*) oder *Cd11c-Cre⁻* Mäusen, normalisiert auf 100mg *Muscularis* und vorgegatet auf Hoechst⁻CD45⁺. SIM n=8; Sham n=5 (C) qRT-PCR Analyse für *Nos2* (iNOS) Expression normalisiert auf *Hprt* (HPRT) von sortierten CD64⁺F4/80⁺ MPs 24h nach Sham oder SIM in *Cd11c-Cre⁺* oder *Cd11c-Cre⁻* Mäusen. n.d. = nicht detektierbar; SIM n=8; Sham n=4. Resultate sind dargestellt als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts. *p<0.05; **p<0.01. Die Ergebnisse dieser Abbildung sind ebenfalls in der angeschlossenen Publikation veröffentlicht [Pohl et al. 2017].

7.4 Nach intestinaler Manipulation des Dünndarms wandern Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} Monozyten in die *Muscularis* ein, dieser Influx ist in *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen deutlich vermindert

Um die Rolle der durch CD103$^+$CD11b$^+$ DZ aktivierten Monozyten/Makrophagen näher zu untersuchen, wurde zuerst der Phänotyp dieser Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Wie bereits in Kap. 4.3 beschrieben untergliedern sich Monozyten im Blut und MPs im Darm durch ihre Expression der Oberflächenmarker Ly6C und CX$_3$CR1. Wir untersuchten daher die Expression dieser Marker auf F4/80$^+$ MPs in der *Muscularis* von Sham Mäusen oder intestinal manipulierten (SIM) Mäusen. Da der Rezeptor CX$_3$CR1 nicht mit Hilfe von Antikörpern nachweisbar ist, wurden hierzu heterozygote *Cx$_3$cr1*$^{GFP/+}$ Mäuse verwendet.

Die *Muscularis* des Dünndarms von scheinoperierten Mäusen enthielt hierbei hauptsächlich MPs, die kein Ly6C, aber sehr hoch CX$_3$CR1 (CX$_3$CR1^{high}) exprimierten (Abb. 13A, B). Die Manipulation des Dünndarms hingegen rief einen starken Influx von MPs hervor, die nur wenig CX$_3$CR1 (CX$_3$CR1^{low}) exprimierten, aber positiv für den Marker Ly6C waren (Abb. 13A, C). Da die Auswanderung von Ly6C$^+$ Monozyten aus dem Knochenmark von CCR2 abhängig ist, und diese Monozyten häufig nach inflammatorischen Stimuli in das entzündete Gewebe einwandern, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Anzahl der Ly6C$^+$ Monozyten nach SIM in CCR2 defizienten (*Ccr2*$^{-/-}$) Mäusen vermindert sein könnte.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden *Ccr2*$^{-/-}$ Mäuse verwendet, die außerdem heterozygot GFP im CX$_3$CR1-Lokus exprimieren (*Ccr2*$^{-/-}$ *x Cx$_3$cr1*$^{GFP/+}$). In der Tat fehlten nach SIM einwandernde Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs in *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen fast komplett (Abb. 13C). Die Anzahl an Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs hingegen war in *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen nicht signifikant verändert (Abb. 13B).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse zwei verschiedene Populationen von Makrophagen in der *Muscularis* auf: Residente Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs und nach SIM einwandernde, so genannte inflammatorische Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs, deren Anzahl in der *Muscularis* nach SIM von CCR2 abhängig ist [Pohl et al. 2017].

Während es nach einem inflammatorischen Stimulus in vielen Organen zur Einwanderung von Monozyten aus der Zirkulation kommt, bildet die *Lamina propria* des

Darms partiell eine Ausnahme (Kap. 4.3.3). Die inflammatorischen MPs proliferieren hier auch lokal. Auf Grund des in der *Muscularis*, im Vergleich zur *Lamina propria*, nicht ständig vorhandenen inflammatorischen Stimulus, wurde hypothetisiert, dass der Influx in die *Muscularis* nach SIM durch die Zirkulation erfolgt.

Wir markierten daher mit Hilfe fluoreszenter Beads entweder Ly6C^{+} Monozyten (Abb. 13D) oder Ly6C^{-} Monozyten im Blut (Abb. 13E). Nach der Markierung von Ly6C^{+} Monozyten und SIM, ließ sich eine Population Ly6C^{+}CX$_{3}$CR1^{low} MPs nachweisen, die Beads enthielt. In den residenten Ly6C^{-}CX$_{3}$CR1^{high} MPs und in der scheinmanipulierten *Muscularis* fanden sich hingegen keine Bead^{+} Zellen (Abb. 13D). Ebenso fanden sich in der *Muscularis* keine Bead^{+} MPs, wenn vorher Ly6C^{-} Monozyten im Blut markiert wurden (Abb. 13E).

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass es nach SIM zu einer Einwanderung von Ly6C^{+} Monozyten aus dem Blut, die in *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen fehlen, in die *Muscularis* kommt, und diese Monozyten, zumindest direkt nach der Manipulation, nur zu den Ly6C^{+}CX$_{3}$CR1^{low} MPs, aber nicht zu den residenten Ly6C^{-}CX$_{3}$CR1^{high} MPs beitragen.

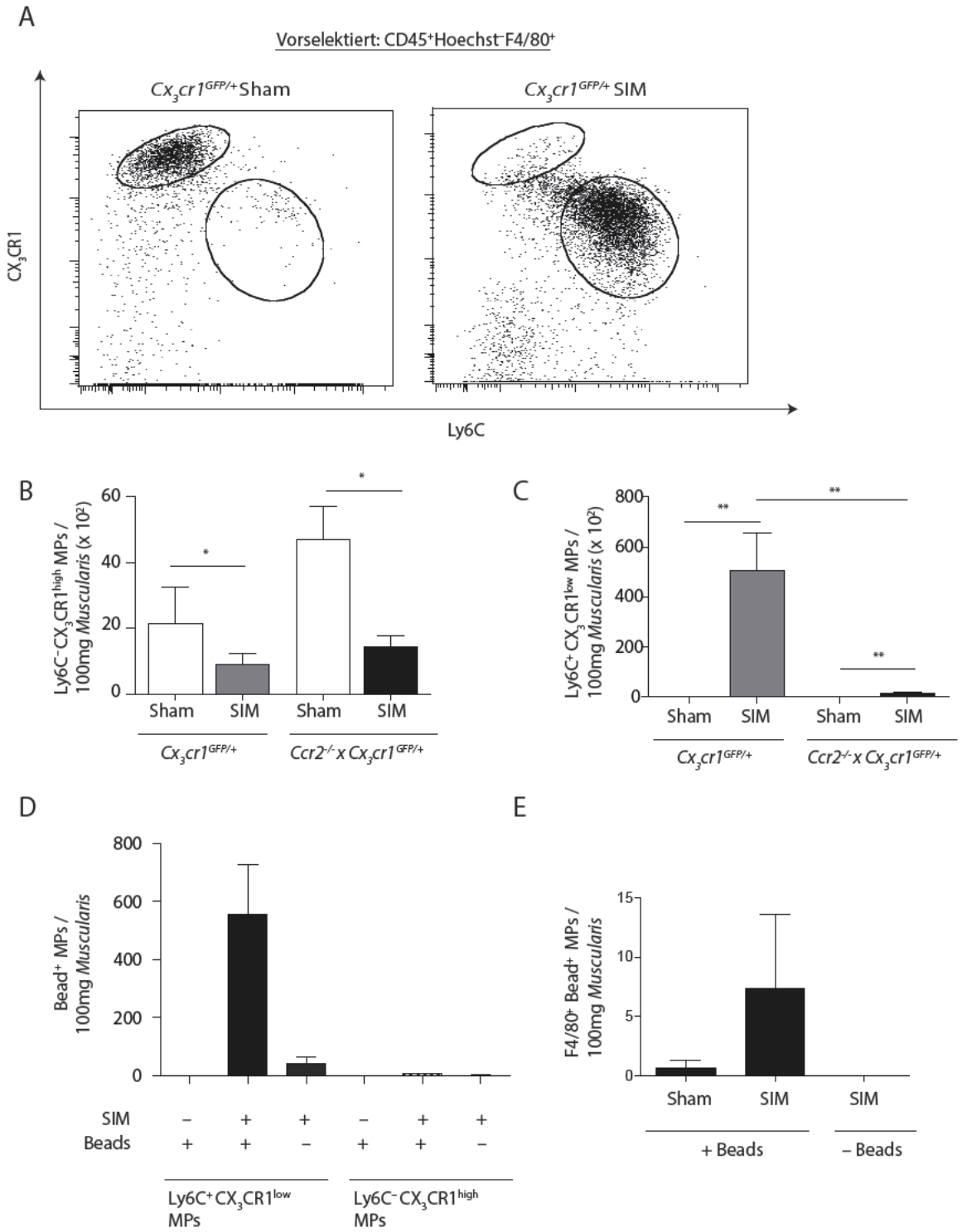

Abb. 13: Die Anwesenheit von inflammatorischen, aus dem Blut einwandernden Ly6C+CX3CR1low MPs nach SIM hängt von CCR2 ab, die von residenten Ly6C-CX3CR1high MPs nicht. (A) Gating Schema zur Analyse von *Muscularis* MPs 24h nach Dünndarmmanipulation (SIM) in einer *Cx3cr1GFP/+* Maus. (B, C) Durchflusszytometrisch ermittelte Anzahl an Ly6C-CX3CR1high MPs (B) und Ly6C+CX3CR1low MPs (C) 24h nach Sham oder SIM in *Cx3cr1GFP/+* oder *Ccr2-/- x Cx3cr1GFP/+* Mäusen, normalisiert auf 100mg *Muscularis*, vorgegatet auf CD45+F4/80+ (B-C, n=8). (D-E) Anzahl Bead+ Ly6C+CX3CR1low und Ly6C-CX3CR1high MPs (D) oder F4/80+ MPs (E) 24h nach SIM oder Scheinmanipulation (– SIM) und 42h nach der Markierung mit Fluoresbrite YG beads von Ly6C+ (D) oder Ly6C- (E) Blutmonozyten (+Beads) oder ohne Markierung (–Beads); normalisiert auf 100mg *Muscularis,* vorgegatet auf CD45+F4/80+ (D) oder CD45+ (E) (n=2-5). Resultate sind dargestellt als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts. *p<0.05; **p<0.01. Teilergebnisse dieser Abbildung sind ebenfalls in der angeschlossenen Publikation veröffentlicht [Pohl et al. 2017]. Die Ergebnisse dieser Abbildung sind unter Betreuung von mir in Zusammenarbeit mit Judith-Mira Pohl entstanden.

7.5 Das Fehlen von Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} Makrophagen in *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen löst den Postoperativen Ileus nicht auf

Die vorangegangen Ergebnisse haben gezeigt, dass es nach SIM zu einer durch CD103$^+$CD11b$^+$ DZ stimulierten iNOS-Produktion in MPs und zu einem Influx Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} inflammatorischer Monozyten aus dem Blut in die *Muscularis* kommt. Des Weiteren hatten frühere Arbeiten (sh. Kap. 4.4) gezeigt, dass MPs und iNOS-Produktion notwendig zur Ausbildung eines POI sind. In diesem Zusammenhang stellten wir daher die Hypothese auf, dass Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs in der *Muscularis* für den POI benötigt werden.

Um diese Hypothese zu überprüfen, führten wir einen Dünndarmtransit mittels FITC-Dextran (sh. Kap. 6.3.2) in *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen durch, denen diese MPs nach SIM in der *Muscularis* fehlten (Abb. 13). Mit Hilfe von Sham-manipulierten Kontrollen konnte gezeigt werden, dass sowohl *Ccr2*$^{-/-}$ als auch Wildtyp (WT; in dieser Arbeit immer C57Bl/6) Mäuse nach SIM einen POI entwickeln (Abb. 14A, B). Es zeigte sich jedoch, dass die Darmmotilität in manipulierten *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu manipulierten WT-Mäusen nicht verbessert ist. Es kommt also auch in *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen, trotz des Fehlens von Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs, nach SIM zu einem POI (Abb. 14A,B).

Da demnach Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs nicht oder nicht alleine nach SIM für die Paralyse der Muskulatur in der *Muscularis* verantwortlich sind, fuhren wir mit einem Experiment zur Bestimmung der iNOS-Produktion nach SIM, von sowohl Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs als auch von den residenten Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs, fort. Hierzu wurden beide Makrophagengruppen mittels durchflusszytometrischer Sortierung getrennt und mittels qRT-PCR auf die Expression von iNOS mRNA (Nos2) untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl residente Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs als auch Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs nach SIM iNOS produzieren (Abb. 14C). Residente MPs in der *Muscularis* von Sham und Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} Monozyten im Blut von SIM und Sham manipulierten Mäusen exprimierten hingegen kein iNOS.

Somit konnte gezeigt werden, dass in der *Muscularis* des Dünndarms nach SIM beide Makrophagengruppen iNOS produzieren, und potenziell residente sowie einwandernde, inflammatorische MPs zum POI beitragen [Pohl et al. 2017].

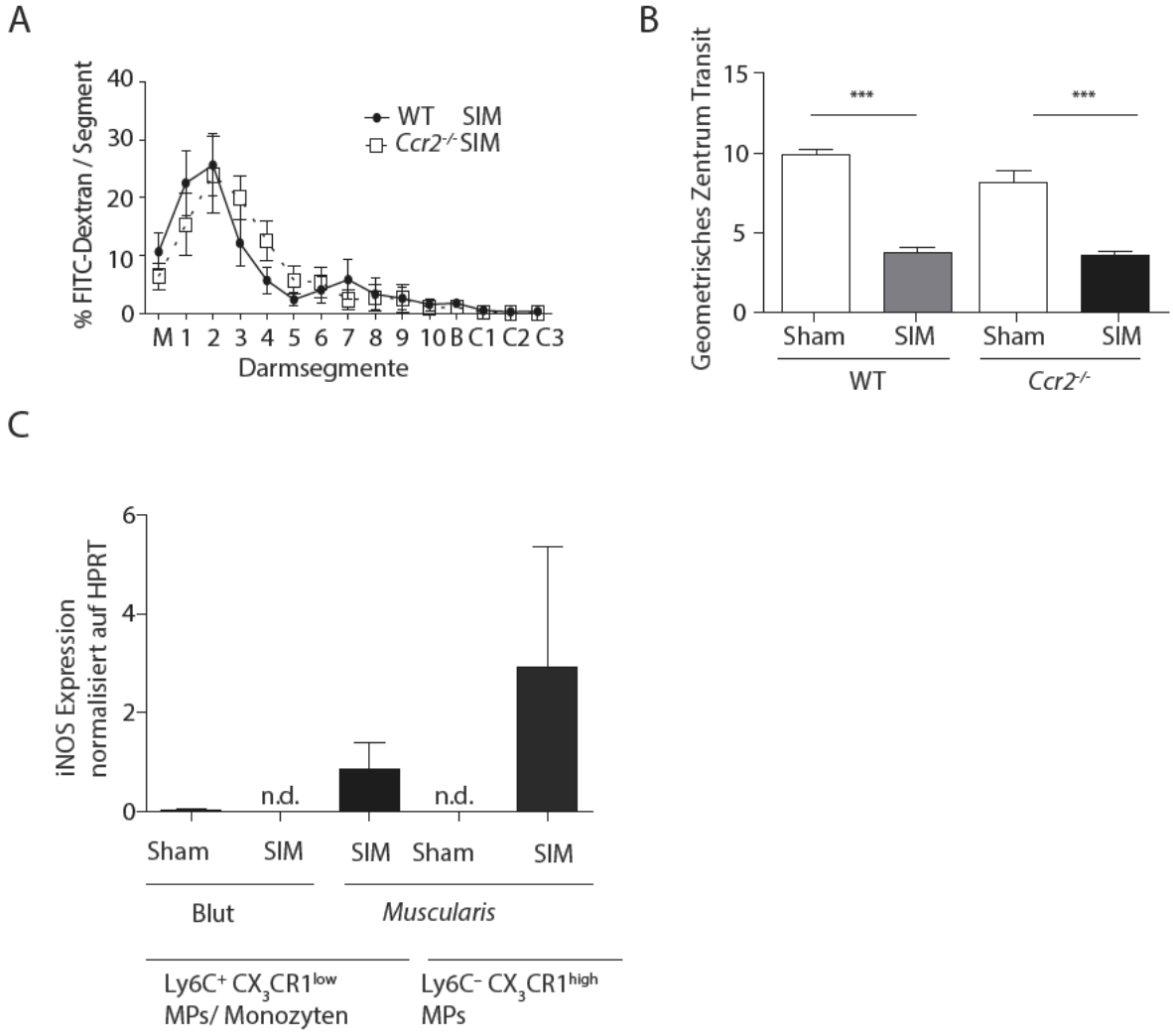

Abb. 14: Die Abwesenheit von CCR2 abhängigen Ly6C⁺CX₃CR1^{low} MPs beeinflusst den Ileus nach SIM nicht, auch Ly6C⁻CX₃CR1^{high} MPs exprimieren iNOS nach Manipulation. (A,B) Analyse des Dünndarmtransits (A: Verlauf der FITC-Dextran Verteilung im gastrointestinalen Trakt; B: geometrisches Zentrum des FITC-Dextran Signals) in *Ccr2*$^{-/-}$ und WT Mäusen 24h nach SIM (n=8) oder Sham (n=5). M = Magen; 1-10 = Dünndarmsegmente; B = Blinddarm; C1-3 = Kolonsegmente. (C) qRT-PCR Analyse für *Nos2* (iNOS) Expression normalisiert auf *Hprt* (HPRT) von sortierten Hoechst⁻CD45⁺CD115⁺Ly6C⁺CX₃CR1^{low} Monozyten im Blut und Hoechst⁻CD45⁺F4/80⁺Ly6C⁺CX₃CR1^{low} MPs in der manipulierten (SIM) *Muscularis* 24h nach Sham oder SIM, sowie von Hoechst⁻CD45⁺F4/80⁺Ly6C⁻CX₃CR1^{high} MPs in der *Muscularis* 24h nach Sham oder SIM, beides in *Cx₃cr1*$^{GFP/+}$ Mäusen. n.d. = nicht detektierbar; Repräsentative Blutdaten n=8; *Muscularis* n=8. Resultate sind dargestellt als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts. ***p<0.001. Die Ergebnisse dieser Abbildung sind ebenfalls in der angeschlossenen Publikation veröffentlicht [Pohl et al. 2017].

7.6 Die Depletion von Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} Makrophagen mit Clodronat Liposomen beeinflusst den Ileus ebenfalls nicht

Um das vorangegangene Resultat, dass das Fehlen von Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs zu keinem verbesserten jejunalen Transit nach SIM führt, zu überprüfen, und um eine weitere Depletionsmethode für diese MPs zur Verfügung zu haben, wurden *Cx$_3$cr1$^{GFP/+}$* Mäuse mit Clodronat Liposomen (CloLip) behandelt (sh. Kap. 6.3.10) und mittels SIM ein Ileus induziert. Die Überprüfung des Depletionserfolgs wurde in der manipulierten *Muscularis* mittels durchflusszytometrischer Analyse durchgeführt, die eine signifikante, deutliche Reduktion von Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs in CloLip behandelten gegenüber unbehandelten Mäusen aufzeigte (Abb. 15A). Im Gegensatz hierzu zeigte die Analyse für Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs keine signifikante Änderung auf (Abb. 15B). Somit beeinflussen Clodronat Liposomen, wie CCR2, nur die Anzahl von Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs.

Es zeigte sich außerdem, in Übereinstimmung mit dem Resultat in *Ccr2$^{-/-}$* Mäusen, keine Verbesserung des Dünndarmtransits in CloLip-behandelten Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 15C) [Pohl et al. 2017].

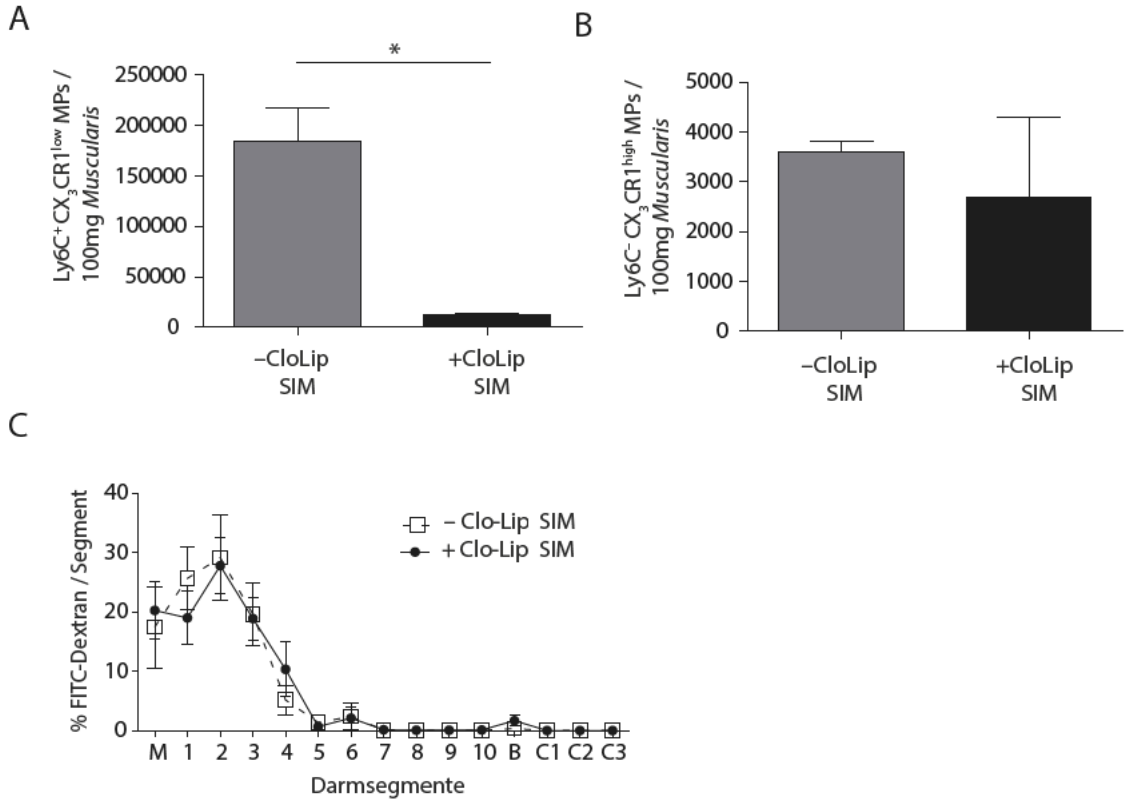

Abb. 15: Clodronat Liposomen depletieren Ly6C⁺CX₃CR1^{low} aber nicht Ly6C⁻CX₃CR1^{high} MPs, dies beeinflusst den Ileus nach SIM nicht. (A, B, C) Durchflusszytometrische Analyse der Anzahl von Ly6C⁺CX₃CR1^{low} MPs (A) und Ly6C⁻CX₃CR1^{high} MPs (B) in der Dünndarmmuscularis (A, B) und Dünndarmtransit (C) 24h nach SIM in *Cx₃cr1$^{GFP/+}$* Mäusen behandelt mit Clodronat Liposomen (+CloLip) oder in unbehandelten Mäusen (–CloLip) (n=9). (C) M = Magen; 1-10 = Dünndarmsegmente; B = Blinddarm; C1-3 = Kolonsegmente. Durchflusszytometrische Analysen sind normalisiert auf 100mg *Muscularis*. Resultate sind dargestellt als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts. *p<0.05. Teilergebnisse dieser Abbildung sind ebenfalls in der angeschlossenen Publikation veröffentlicht [Pohl et al. 2017]. Die Ergebnisse von (C) sind unter Betreuung von mir in Zusammenarbeit mit Judith-Mira Pohl entstanden.

7.7 Sowohl Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} als auch Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} Makrophagen sind jeweils hinreichend zur Entstehung eines Postoperativen Ileus im Dünndarm

Da eine Depletion von Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs sowohl in *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen als auch mittels Clodronat Liposomen zu keiner Verbesserung der Dünndarmmotilität nach POI führte (Abb. 14A, B und Abb. 15C), stellten wir die Hypothese auf, dass der POI von Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs verursacht wird. Da Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs sowohl von CloLip als auch in *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen nicht depletiert werden, verwendeten wir *Cx$_3$cr1-Cre$^+$ iDtr ^{flox}* Mäuse. Diese exprimieren in Zellen (Kap. 4.3.3), die CX$_3$CR1 positiv sind oder waren, den Diphteria-Toxin-Rezeptor (DTR) und diese können dann mittels Administration von Diphteria Toxin (DT) depletiert werden.

Bei Gabe von DT in *Cx$_3$cr1-Cre$^+$ iDtr ^{flox}* Mäusen würde es zusätzlich zu einer Depletion der Mikroglia im zentralen Nervensystem kommen – mit der Folge möglicher neuronaler Seiteneffekte auf das Immunsystem und die Darmmotorik (Kap. 4.4.1). Um dies zu vermeiden, verwendeten wir das Knochenmark (KM) dieser Mäuse, um, mit Hilfe von bestrahlten C57Bl/6 Mäusen als Empfängern, Knochenmarkschimären zu generieren (KM-iDTR). Als Kontrolle wurde C57Bl/6 KM in bestrahlte C57Bl/6 Mäuse transferiert (KM-WT).

Um die Depletion in den Knochenmarkschimären zu überprüfen, verabreichten wir KM-iDTR Mäusen DT. Da in den KM-iDTR Mäusen kein CX$_3$CR1-GFP Signal zur Verfügung steht, wurden zur Analyse der MPs die Marker Ly6C und F4/80 verwendet und die Analyse der residenten Ly6C$^-$ MPs in Sham-Mäusen durchgeführt, während zum Nachweis von Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs SIM Mäuse eingesetzt wurden.

In der Tat waren Ly6C$^-$F4/80$^+$ MPs in DT behandelten Mäusen gegenüber unbehandelten KM-WT Mäusen deutlich reduziert (Abb. 16A). Die Anzahl an Ly6C$^+$F4/80$^+$ MPs war hingegen nicht verändert (Abb. 16B). Außerdem zeigte sich im Rahmen dieser Untersuchungen eine Reduktion von Ly6C$^+$ Blutmonozyten (Abb. 16C) und eine 40%ige Reduktion von CD103$^+$CD11b$^+$ DZ in der *Muscularis* (Abb. 16D) nach DT Gabe in KM-iDTR Mäusen.

Als wir nach POI-Induktion den Dünndarmtransit in KM-WT mit DT behandelten KM-iDTR Mäusen verglichen, stellten wir jedoch keine Verbesserung der Dünndarmmotorik in depletierten Mäusen fest (Abb. 16E, F). Somit ist die alleinige

Depletion von Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs nicht ausreichend, um die Darmmotorik nach POI-Induktion zu verbessern.

Dies weist darauf hin, dass beide Makrophagentypen den POI auslösen können. Um dies zu untersuchen, kombinierten wir die DT-Gabe in KM-iDTR Mäusen, die Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs depletiert, mit der Gabe von Clodronat Liposomen, um zusätzlich noch Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs zu depletieren.

In der Tat zeigte sich in Mäusen, bei denen sowohl residente, als auch inflammatorische MPs depletiert worden waren, eine signifikante Verbesserung der Dünndarmmotorik nach POI-Induktion gegenüber den Kontroll-Gruppen (Abb. 16F).

Somit wird im Dünndarm für einen POI nur einer der beiden Makrophagentypen benötigt. Die alleinige Depletion von entweder Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} oder Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs ist zur Verbesserung der Dünndarmmotilität nach SIM nicht ausreichend [Pohl et al. 2017].

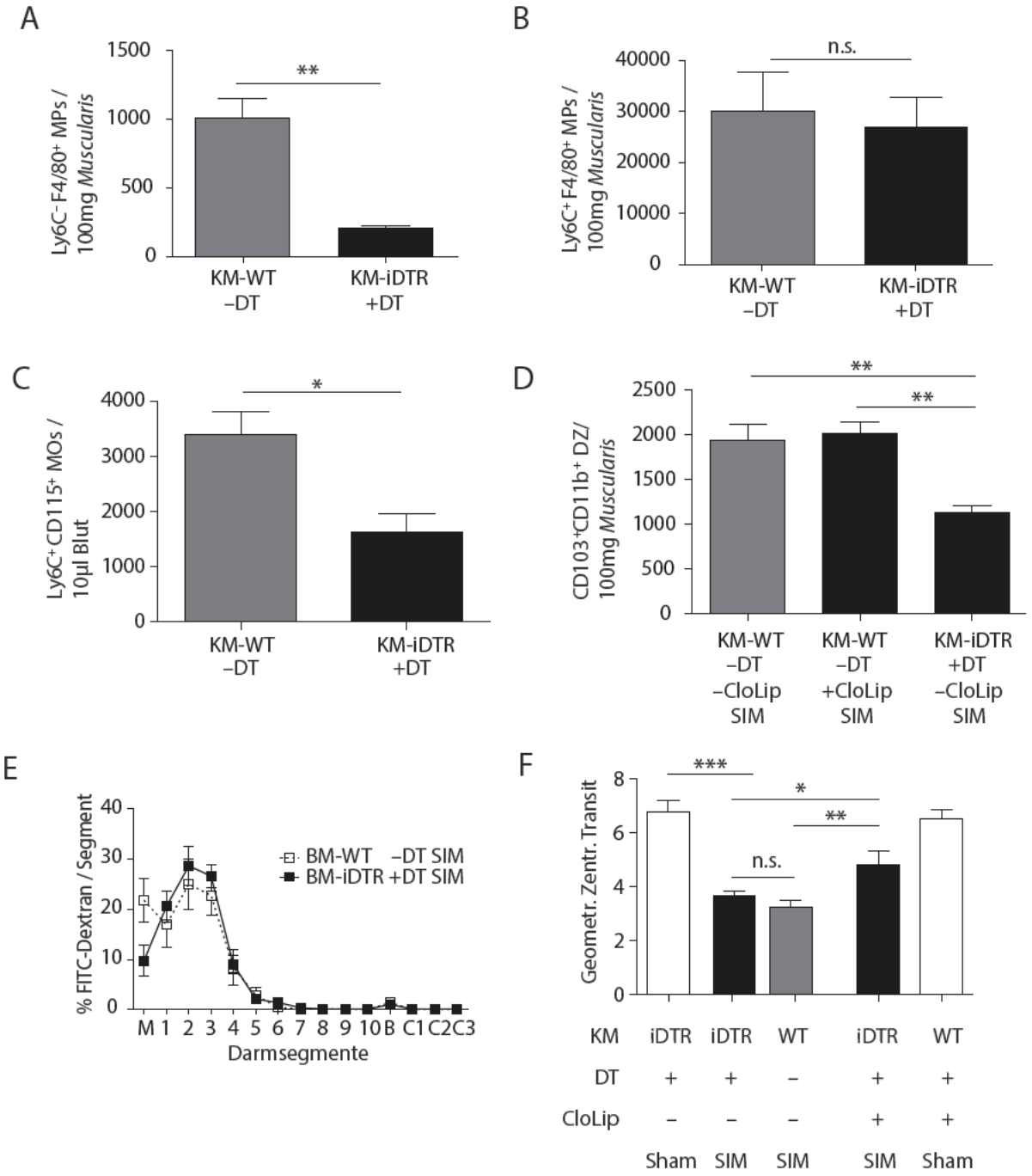

Abb. 16: Der POI des Dünndarm wird induziert von Ly6C⁻CX₃CR1^{high} MPs oder Ly6C⁺CX₃CR1^{low} MPs. (A-C) Anzahl von Ly6C⁻F4/80⁺ MPs (A) , Ly6C⁺F4/80⁺ MPs (B) und Ly6C⁺CD115⁺ (C) Monozyten (MOs) im Blut (C) oder der *Muscularis* (A,B) und in manipulierten (B, C) oder unmanipulierten (A) *Cx₃cr1-Cre⁺ iDtr ^{flox}* (KM-iDTR) bzw. C57Bl/6 (KM-WT) Knochenmarkschimären, behandelt mit Diphteriatoxin (+DT) oder unbehandelt (–DT) (repräsentative Daten n=7). Vorgegatet Hoechst⁻CD45⁺. (D) Anzahl von Hoechst⁻CD45⁺MHCII⁺CD11c⁺CD103⁺CD11b⁺ DZ in manipulierten (SIM) *Cx₃cr1-Cre⁺ iDtr ^{flox}* (KM-iDTR) bzw. C57Bl/6 (KM-WT) Knochenmarkschimären, behandelt mit Diphteriatoxin (+DT), ohne DT-Gabe (–DT), zusätzlich behandelt mit Clodronat Liposomen (+CloLip) oder unbehandelt (–CloLip) (repräsentative Daten von n=8). (E-F) Analyse des Dünndarmtransits (E: Verlauf der FITC-Dextran Verteilung im gastrointestinalen Trakt; F: geometrisches Zentrum des FITC-Dextran Signals) *in Cx₃cr1-Cre⁺ iDtr ^{flox}* (KM-iDTR) bzw. C57Bl/6 (KM-WT) Knochenmarkschimären, DT behandelt oder unbehandelt (+/–DT) bzw. CloLip behandelt oder unbehandelt (+/–CloLip) 24h nach SIM (SIM n=11, SIM mit DT und CloLip n=7) oder Sham (n=4) (M = Magen; 1-10 = Dünndarmsegmente; B = Blinddarm; C1-3 = Kolonsegmente). Durchflusszytometrische Analysen sind normalisiert auf 100mg *Muscularis* bzw. 10µl Blut. Resultate sind dargestellt als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. Die Ergebnisse dieser Abbildung sind ebenfalls in der angeschlossenen Publikation veröffentlicht [Pohl et al. 2017].

7.8 Zusätzlich zu residenten Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} Makrophagen wandern nach Dünndarmmanipulation Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} Makrophagen in den Dickdarm ein

Sowohl in vorherigen Publikationen (sh. Kap. 4.4.4) als auch in dieser Arbeit (Abb. 11) wurde aufgezeigt, dass es nach SIM zu einer Disseminierung des POI in nicht manipulierte Regionen des Magen-Darm-Traktes kommt. Wir fuhren deshalb mit unseren Untersuchungen im Dickdarm, im Hinblick auf die im Dünndarm erzielten Ergebnisse, fort.

Hierzu begannen wir mit einer Analyse von Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs und Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs im Dickdarm nach SIM. Analog zur Situation im Dünndarm, fanden sich auch im Dickdarm nach Sham-Operation keine inflammatorischen Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs sondern nur residente Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs (Abb. 17A, B, C). Nach SIM kam es, wiederum analog zur Situation im Dünndarm, zu einer Einwanderung inflammatorischer Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs (Abb. 17A, B, C).

Um ein Werkzeug zur Analyse der MPs beim POI im Dickdarm zur Verfügung zu haben, untersuchten wir *Ccr2*$^{-/-}$ *x Cx$_3$cr1*$^{GFP/+}$ Mäuse auf das Vorhandensein von inflammatorischen Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs. In der Tat zeigte sich, dass auch im Dickdarm nach SIM inflammatorische Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs deutlich reduziert sind (Abb. 17B), während sowohl nach Sham-Operation als auch nach SIM keine Veränderung der Anzahl an residenten Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs zu beobachten ist (Abb. 17C).

Somit sind im Dickdarm sowohl für residente als auch inflammatorische Makrophagenpopulationen ähnliche Verhältnisse wie im Dünndarm anzutreffen. Ebenso ist der Verlust von inflammatorischen MPs in *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen auch im Dickdarm festzustellen [Pohl et al. 2017].

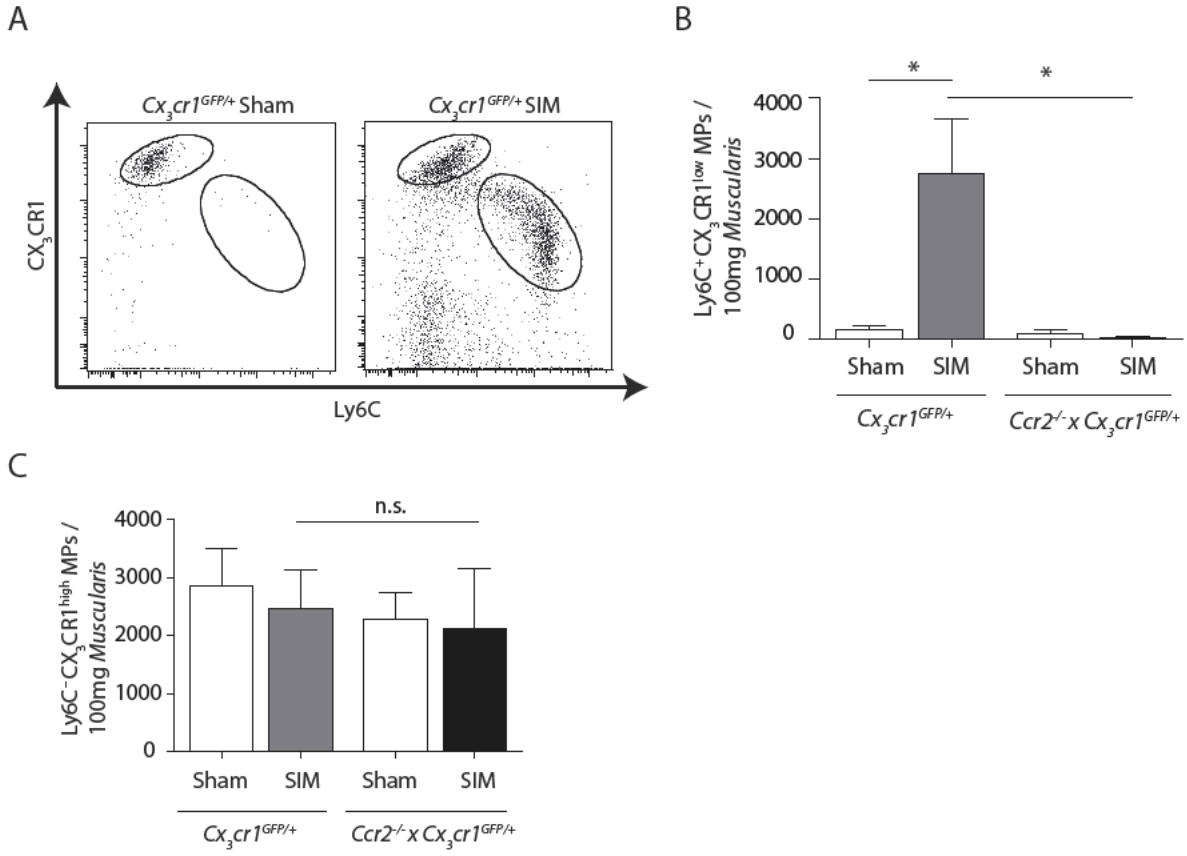

Abb. 17: Die Anwesenheit von inflammatorischen Ly6C⁺CX₃CR1^{low} MPs nach SIM findet sich auch im Dickdarm und hängt von CCR2 ab. Auch residente, von CCR2 unabhängige, Ly6C⁻CX₃CR1^{high} MPs sind im Dickdarm vorhanden. (A) Gatingschema zur Analyse der *Muscularis* des Dickdarms für MPs 24h nach SIM in einer *Cx₃cr1$^{GFP/+}$* Maus und durchflusszytometrisch ermittelte Anzahl (B,C) an Ly6C⁺CX₃CR1^{low} MPs (B) und Ly6C⁻CX₃CR1^{high} MPs (C) 24h nach Sham oder SIM in *Cx₃cr1$^{GFP/+}$* oder *Ccr2$^{-/-}$ x Cx₃cr1$^{GFP/+}$* Mäusen, normalisiert auf 100mg *Muscularis*, vorgegatet auf Hoechst⁻CD45⁺F4/80⁺ (A-C, n=8). Resultate sind dargestellt als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts. *p<0.05. Die Ergebnisse dieser Abbildung sind ebenfalls in der angeschlossenen Publikation veröffentlicht [Pohl et al. 2017]. Die Ergebnisse dieser Abbildung sind unter Betreuung von mir in Zusammenarbeit mit Judith-Mira Pohl entstanden.

7.9 Der Ileus des Dickdarms hängt von inflammatorischen $Ly6C^{+}CX_3CR1^{low}$ Makrophagen ab

Wir fuhren mit der Untersuchung, welche Rolle $Ly6C^{+}CX_3CR1^{low}$ MPs beim POI des Dickdarms spielen fort. Hierzu wurde in WT und *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen mittels SIM ein Ileus induziert. Dann überprüften wir, durch definierte retrograde Insertion einer Glaskugel in den Dickdarm und Messung der Exkretionszeit, die Motilität des Dickdarms (Dickdarmtransit, sh. Kap. 6.3.3).

In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen und Analysen aus dieser Arbeit, disseminierte der Ileus in gentechnisch nicht veränderten (WT) Mäusen nach SIM auch in den Dickdarm (Abb. 18A). Im Gegensatz zum Dünndarm führte das Fehlen von inflammatorischen $Ly6C^{+}CX_3CR1^{low}$ MPs in *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen allerdings zu einem verkürzten Dickdarmtransit im Vergleich zu ebenfalls manipulierten WT-Mäusen.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren und genetische Effekte durch das Fehlen von CCR2 auszuschließen, manipulierten wir mit Clodronat Liposomen (CloLip) behandelte Mäuse und verglichen diese mit einer unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 18B). Auch hier kam es nach CloLip Behandlung zu einem reduzierten Dickdarmtransit.

Somit hängt der Ileus des Dickdarms nach SIM von $Ly6C^{+}CX_3CR1^{low}$ MPs im Dickdarm ab. Die zusätzliche Depletion von $Ly6C^{-}CX_3CR1^{high}$ MPs wird zur Verbesserung der Dickdarmmotilität nicht benötigt [Pohl et al. 2017].

Um die Diskrepanz zwischen Dünn- und Dickdarm zu erklären, stellten wir die Hypothese auf, dass durch die Manipulation im Dünndarm freigesetzte DAMPs (*Danger Associated Molecular Patterns*), Moleküle die der Detektion von Gefahr im Immunsystem dienen, zur Aktivierung von $Ly6C^{-}CX_3CR1^{high}$ MPs benötigt werden. Dahingegen könnten bei der Disseminierung in den Dickdarm, wenn der Dünndarm manipuliert wurde, nur $Ly6C^{+}CX_3CR1^{low}$ MPs aktiviert werden, da im Dickdarm in diesem Fall keine DAMPs freigesetzt werden.

Um dies zu überprüfen, wiederholten wir den Dickdarmtransit in *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen, manipulierten allerdings den Dick- und nicht den Dünndarm (LIM: *Large Intestinal Manipulation*). Es kam aber auch in diesem Versuch zu einer Reduktion des Dickdarmtransits in *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen. Die unterschiedliche Abhängigkeit des POI von

residenten und inflammatorischen MPs zwischen Dünn- und Dickdarm lässt sich somit nicht durch den Manipulationsort erklären [Pohl et al. 2017].

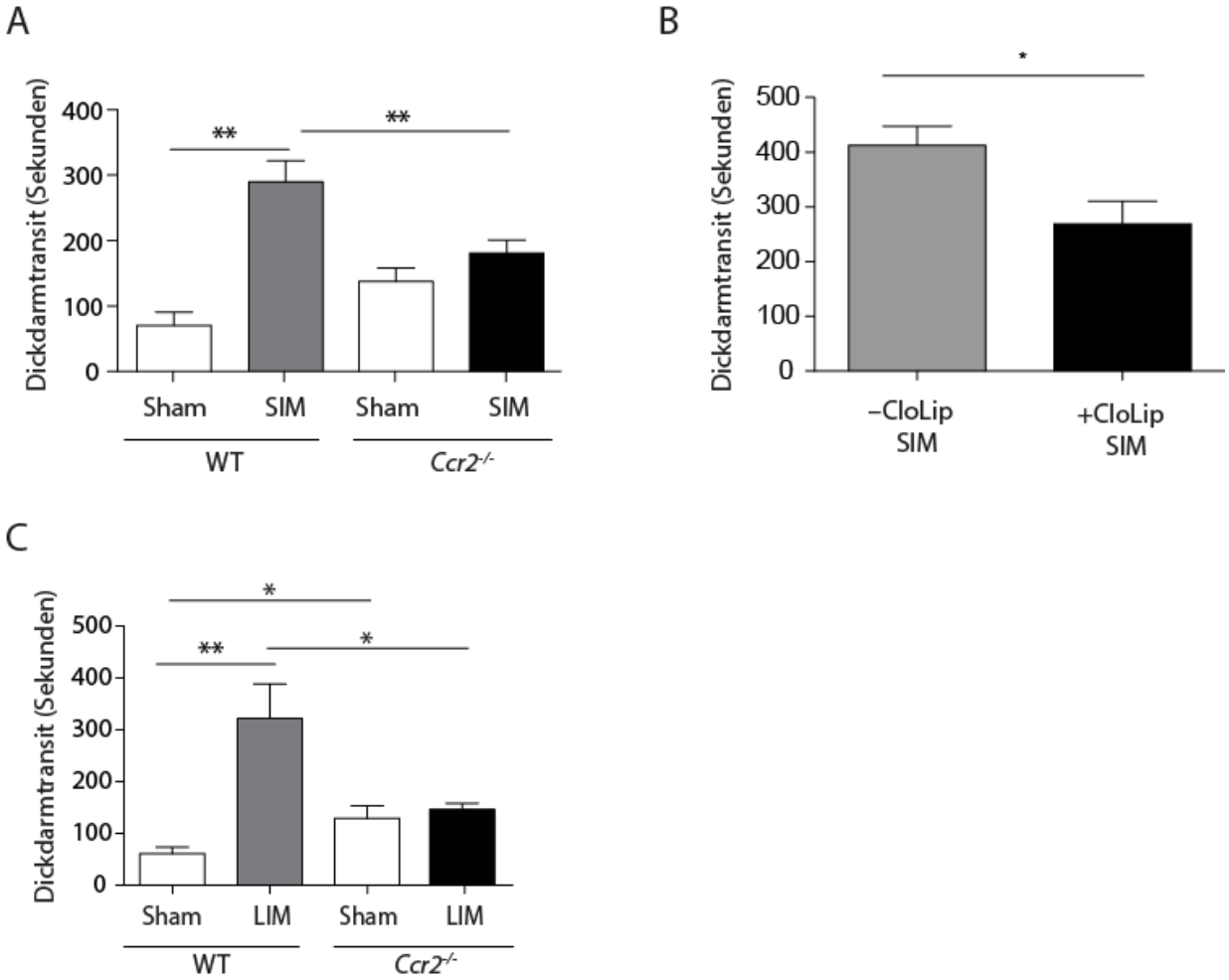

Abb. 18: Der POI des Dickdarms hängt von Ly6C^{+}CX$_{3}$CR1^{low} MPs ab. (A-B) Analyse des Dickdarmtransits in *Ccr2*$^{-/-}$ und C57Bl/6 (WT) (A; SIM n=26, Sham n=5) oder mit Clodronat Liposomen behandelten (+CloLip) bzw. unbehandelten (–CloLip) Mäusen (B; repräsentative Daten von n=9) 24h nach SIM oder Sham. (C) Dickdarmtransit 24h nach intestinaler Manipulation des Dickdarms (LIM) oder Sham von *Ccr2*$^{-/-}$ und WT Mäusen (LIM n=8; LIM WT n=9; Sham n=5). Resultate sind dargestellt als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts. *p<0.05; **p<0.01. Teilergebnisse dieser Abbildung sind ebenfalls in der angeschlossenen Publikation veröffentlicht [Pohl et al. 2017].

7.10 Residente Ly6C⁻CX$_3$CR1^{high} Makrophagen tragen im Dickdarm nach der Manipulation des Dünn- oder Dickdarms nicht zur Produktion von iNOS bei

Auf Grund der vorherigen Ergebnisse, dass das alleinige Fehlen von Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs ausreichend ist, um einen Verlust der Motilität des Dickdarms nach Manipulation zu vermeiden, stellten wir die Hypothese auf, dass Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs im Dickdarm nicht zur iNOS-Produktion beitragen. Um dies zu überprüfen, manipulierten wir *Cx$_3$cr1$^{GFP/+}$* Mäuse und sortierten durchflusszytometrisch Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} und Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs aus dem Dickdarm, um sie dann jeweils mittels qRT-PCR auf die Expression des Gens *Nos2* (iNOS) zu untersuchen. Tatsächlich produzierten im Dickdarm nach SIM nur Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs iNOS, während Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs im Dickdarm kein iNOS exprimierten (Abb. 19A) [Pohl et al. 2017].

Unsere vorangegangen Experimente hatten demonstriert, dass es nach einer Manipulation des Dickdarms zu keinem POI des Dickdarms in manipulierten Mäusen kommt, denen Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs in der *Muscularis* fehlen (Abb. 18C). Entsprechend untersuchten wir auch die iNOS Expression von beiden MPs Subtypen nach LIM durch durchflusszytometrische Sortierung und daran anschließende qRT-PCR. Tatsächlich produzierten auch nach LIM nur inflammatorische Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs, aber nicht residente Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs iNOS (Abb. 19B).

Sowohl die Abhängigkeit des POI von Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs bzw. Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs (Abb. 18) als auch die iNOS-Expression im Dickdarm (Abb. 19) weisen eine Diskrepanz zum Dünndarm auf. Im Dünndarm produzieren beide Subtypen iNOS nach Manipulation (Abb. 14) und beide Subtypen müssen fehlen, damit es zu einer Erhöhung der Motilität nach einer SIM kommt (Abb. 16F). Dies gilt nicht für den Dickdarm, hier produzieren nur Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs iNOS (Abb. 19). Da diese Diskrepanz zwischen Dick- und Dünndarm allerdings nicht durch den Manipulationsort zu erklären ist (Abb. 18 und Abb. 19), sollte es einen intrinsischen Unterschied zwischen Dick– und Dünndarm geben.

Da CD103$^+$CD11b$^+$ DZ MPs zur iNOS-Produktion anregen (Abb. 12), untersuchten wir den Dickdarm durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein von diesen DZ. Es fanden sich sowohl in Sham als auch in SIM Mäusen keine CD103$^+$CD11b$^+$ DZ im Dickdarm (Abb. 19C). Dieses Fehlen von CD103$^+$CD11b$^+$ DZ im Dickdarm im Vergleich zum Dünndarm

könnte somit eine Erklärung für die fehlende iNOS-Produktion von Ly6C⁻CX$_3$CR1^{high} MPs im Dickdarm sein.

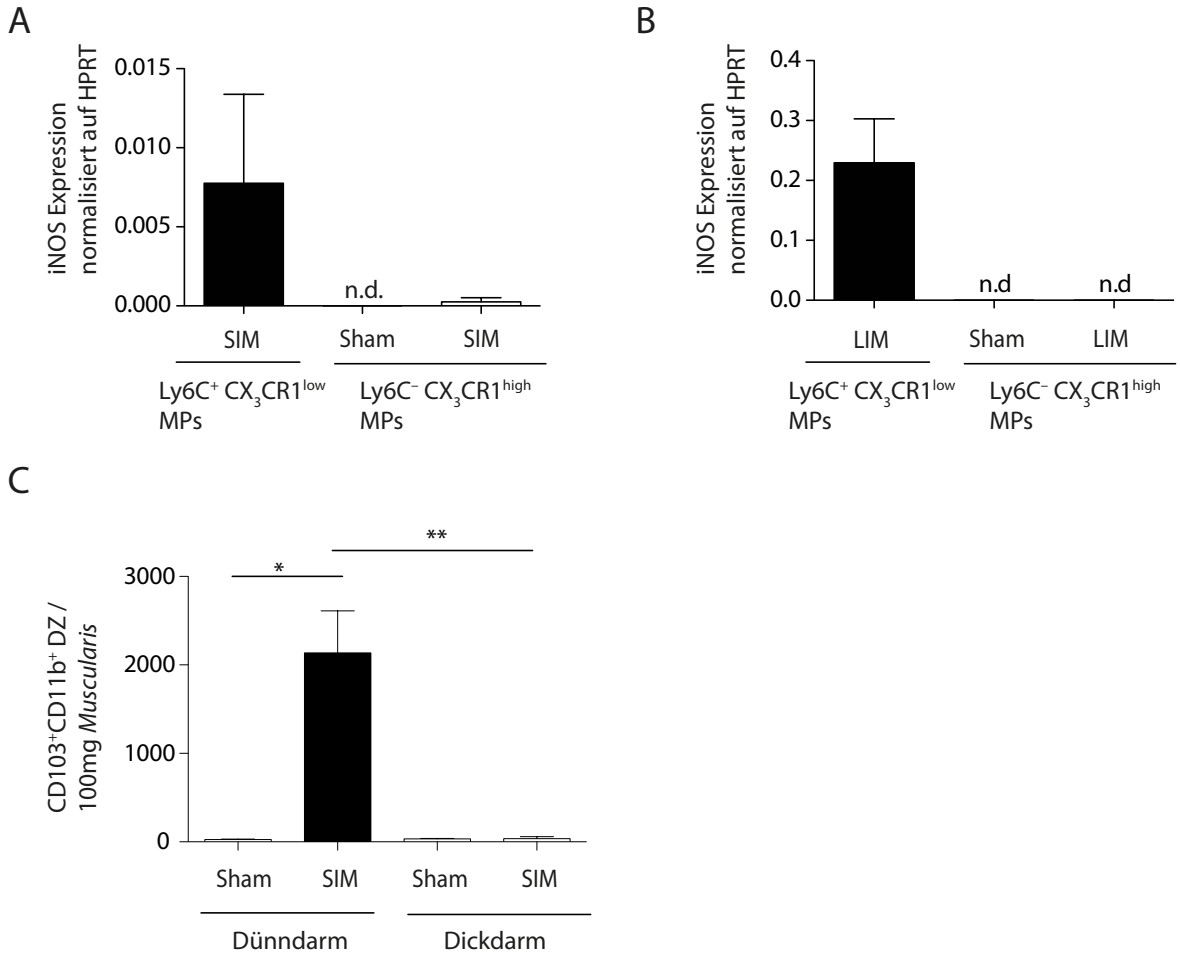

Abb. 19: Ly6C⁻CX$_3$CR1^{high} MPs produzieren im Dickdarm nach Dünn- oder Dickdarmmanipulation kein iNOS, CD103⁺CD11b⁺ DZ fehlen im Dickdarm. (A-B) Im Dickdarm wurden Ly6C⁻CX$_3$CR1^{high} MPs und Ly6C⁺CX$_3$CR1^{low} MPs, vorgegatet auf Hoechst⁻CD45⁺F4/80⁺, durchflusszytometrisch 24h nach SIM (A) oder LIM (B) bzw. Sham (A,B) aus *Cx$_3$cr1$^{GFP/+}$* Mäusen sortiert, dann wurde mittels qRT-PCR die *Nos2* (iNOS) Expression bestimmt. Die Expression wurde normalisiert auf *Hprt* (HPRT) (n.d. = nicht detektierbar; repräsentative Daten n=8). (C) Die Anzahl von CD103⁺CD11b⁺ DZ, vorgegatet auf Hoechst⁻CD45⁺CD11c⁺MHCII⁺ und normalisiert auf 100mg *Muscularis*, wurde durchflusszytometrisch 24h nach SIM oder Sham in WT Mäusen bestimmt (repräsentative Daten SIM n=4, Sham n=3). Resultate sind dargestellt als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts. *p<0.05; **p<0.01. Die Ergebnisse dieser Abbildung sind ebenfalls in der angeschlossenen Publikation veröffentlicht [Pohl et al. 2017].

7.11 Der Postoperative Ileus des Dickdarms hängt vom intestinalen Mikrobiom ab

Ein weiterer Unterschied zwischen Dünn- und Dickdarm liegt in der deutlich stärkeren Besiedlung des Dickdarms durch Mikrobiota. Wir entschieden uns daher, die Effekte des Mikrobioms auf den POI näher zu untersuchen.

Daher wurde Mäusen für 4-6 Wochen Trinkwasser mit zugesetzten Antibiotika (Kap. 6.3.12) verabreicht. Anschließend untersuchten wir die iNOS-Expression mittels qRT-PCR nach SIM in behandelten (+Antibiotika) und unbehandelten (–Antibiotika) Mäusen, die normales Trinkwasser erhielten. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der iNOS-Expression in der *Muscularis* von Antibiotika behandelten Mäusen (Abb. 20A). Dies deutete demzufolge auf eine verminderte Aktivierung von MPs unter Antibiotika-Gabe hin.

Frühere Studien hatten gezeigt, dass nach SIM IFN-γ, produziert durch Th_1-Zellen, MPs zur iNOS-Produktion anregt und diese IFN-γ Sekretion von $CD103^+CD11b^+$ DZ abhängig ist. Wir untersuchten daher, mittels qRT-PCR auf Transkriptionsebene und mittels ELISA auf Proteinebene, die Mengen von IFN-γ in Antibiotika behandelten Mäusen nach SIM. In der Tat fanden wir sowohl mittels qRT-PCR als auch im ELISA eine Reduktion von IFN-γ in Antibiotika behandelten Mäusen (Abb. 20B, C). Dies zeigt eine mögliche Rolle des Mikrobioms in der Aktivierung von $CD103^+CD11b^+$ DZ auf.

Wir stellten weiterhin die Hypothese auf, dass der POI des Dickdarms unter Antibiotika Behandlung vermindert sein müsste. Daher führten wir einen Dickdarmtransit in Antibiotika behandelten Mäusen durch und fanden heraus, dass die Motilität in manipulierten, Antibiotika behandelten Mäusen gegenüber unbehandelten Mäusen, denen reines Trinkwasser gegeben wurde, nach SIM deutlich erhöht ist (Abb. 20D). Somit ist der POI des Dickdarms von einem intakten Mikrobiom abhängig.

Um einen direkten, nicht durch das fehlende Mikrobiom hervorgerufenen, Effekt der Antibiotika auf die Dickdarmmotilität auszuschließen, verabreichten wir mit Antibiotika behandelten Mäusen zusätzlich oral Fäkalien. Dies stellte den POI des Dickdarms wieder her und schloss somit einen Seiteneffekt durch die Antibiotika-Gabe aus.

Insgesamt zeigen diese Daten eine entscheidende Rolle des Mikrobioms für die Aktivierung von DZ und MPs mit anschließender iNOS-Produktion und für den POI des

Dickdarms auf. Eine Rolle des Mikrobioms für die Entstehung eines Dünndarm-POI konnte außerhalb dieser Arbeit nachgewiesen werden [Pohl et al. 2017].

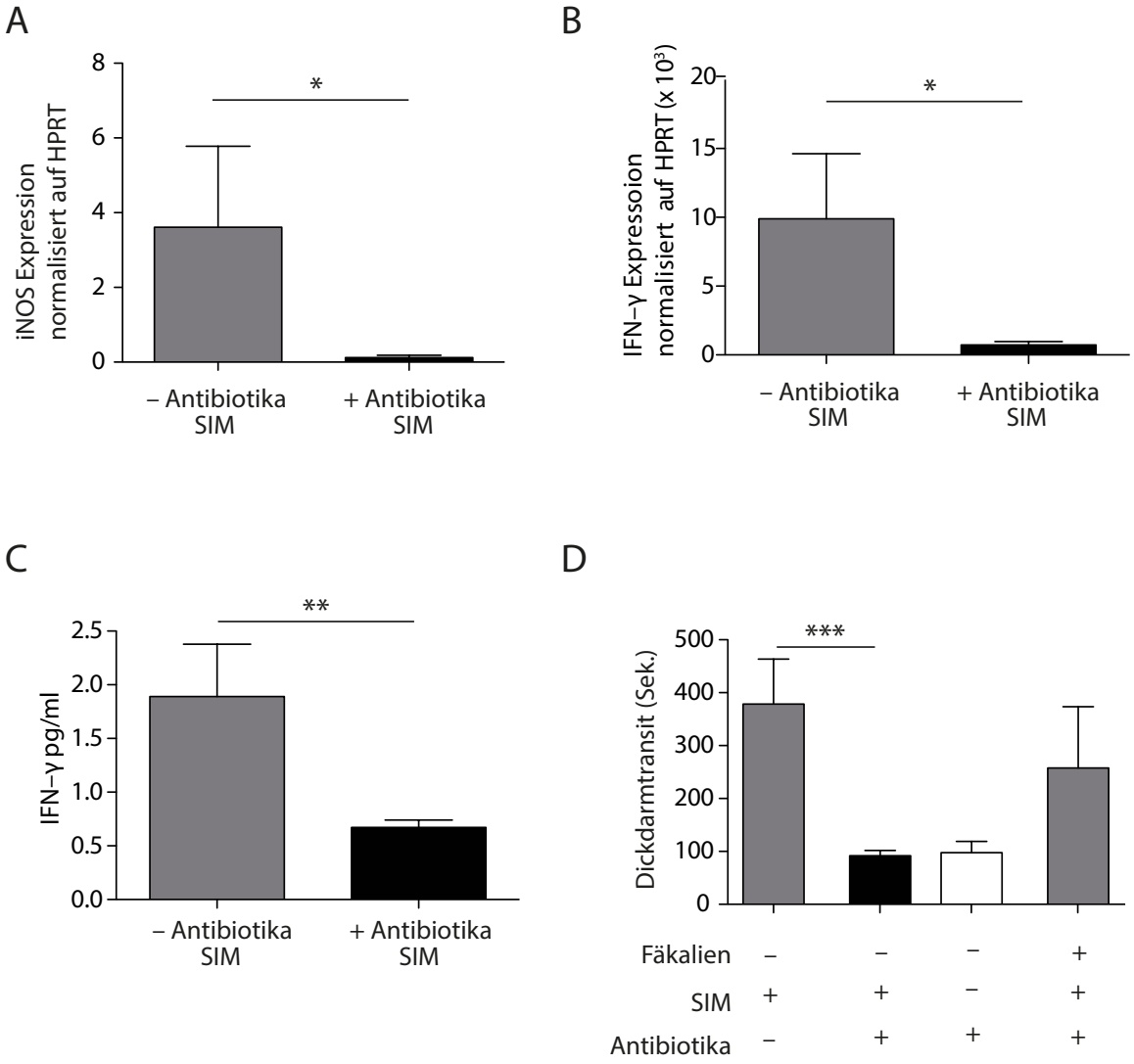

Abb. 20: Die Aktivierung von MPs und der POI des Dickdarms hängen vom Mikrobiom ab. (A-C) Die *Muscularis* des Dünndarms von Antibiotika behandelten (+Antibiotika) und unbehandelten (–Antibiotika) Mäusen wurde 24h nach SIM gewonnen und entweder mittels qRT-PCR (A,B) auf die Expression von *Nos2* (iNOS) (A) oder *Ifn-γ* (B) oder mittels ELISA auf die Proteinkonzentration von IFN-γ (C) untersucht, (A,B) sind normalisiert auf *Hprt* (HPRT) (repräsentative Daten +Antibiotika n=7, –Antibiotika n=4). (D) Dickdarmtransit 24h nach SIM (+SIM) oder Sham (–SIM) von Antibiotika behandelten (+) bzw. unbehandelten (–) C57Bl/6 Mäusen, die teilweise (+) Fäkalien oral 15h vor SIM erhielten (–Antibiotika SIM n=11, +Antibiotika SIM n=15, +Antibiotika –SIM n=7, +Antibiotika +SIM +Fäkalien n=6). Resultate sind dargestellt als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. Teilergebnisse dieser Abbildung sind ebenfalls in der angeschlossenen Publikation veröffentlicht [Pohl et al. 2017].

8 Diskussion

MPs, DZ und das Mikrobiom sind entscheidende Bausteine des Darmimmunsystems, dies zeigen diverse Untersuchungen in der *Lamina propria* [Ko and Chang 2015; Zigmond and Jung 2013; Gross et al. 2015; O. Schulz and Pabst 2013; Denning et al. 2007; Uematsu et al. 2008; Rakoff-Nahoum et al. 2004] und für MPs auch in der *Muscularis externa* [Wehner et al. 2007; Wehner et al. 2009; Muller et al. 2014; Kalff et al. 2000]. In einer früheren Studie konnte beim POI in der *Muscularis* eine entscheidende Rolle von DZ generell und Th_1-Gedächtnis T-Zellen nachgewiesen werden [Engel et al. 2010].

Die hier vorliegende Arbeit zeigt eine Abhängigkeit des POI von IRF4 abhängigen $CD103^+CD11b^+$ DZ und eine zwischen Dünn- und Dickdarm unterschiedliche Abhängigkeit von residenten $Ly6C^-CX_3CR1^{high}$ und inflammatorischen $Ly6C^+CX_3CR1^{low}$ MPs. Zudem wurde ein entscheidender Beitrag des intestinalen Mikrobioms zur Entstehung des POI gezeigt.

Frühere Arbeiten haben nachgewiesen [Engel et al. 2010], dass die generelle Depletion von DZ mit gegen CD11c gerichteten Antikörpern zu einer Resolution des POI führt. In der Literatur werden im Dünndarm vor allem BATF3 bzw. IRF8 abhängige $CD103^+CD11b^-$ DZ beschrieben [Edelson et al. 2010; Geissmann et al. 2010; Ginhoux et al. 2009], die außerdem den Chemokin-Rezeptor XCR1 exprimieren [Becker et al. 2014]. Wir konnten allerdings sowohl in der homöostatischen, als auch in der manipulierten, inflammierten *Muscularis* nur geringe Zellzahlen $CD103^+CD11b^-$ DZ nachweisen. Außerdem verminderte die Depletion dieser Zellen die Entwicklung eines POI nicht. Somit konnten wir eine Rolle dieser Zellen in der Entstehung des POI nahezu ausschließen.

Als weitere DZ sind $CD103^+CD11b^+$ DZ in der *Lamina propria* des Dünndarms vertreten [Persson et al. 2013], die von IRF4 abhängig sind. Nach intestinaler Manipulation kommt es zu einem Anstieg dieser Zellen in der Dünndarmmuscularis (Abb. 10). Im Rahmen dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass auch die $CD103^+CD11b^+$ DZ in der *Muscularis* von dem Transkriptionsfaktor IRF4 abhängig sind. In Mäusen, denen spezifisch in DZ der *Irf4* Lokus fehlte, war die Population $CD103^+CD11b^+$ DZ absent.

Nach der Manipulation des Dünndarms kommt es zu einer iNOS-Produktion durch MPs in der *Muscularis*, die zu einem POI führt [Wehner et al. 2007; Wehner et al. 2009; Kalff et al. 2000]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es beim Fehlen dieser DZ zu keiner iNOS-Produktion durch MPs und damit zu keiner Entwicklung eines Ileus kommt. Die iNOS-Produktion ist somit abhängig von $CD103^+CD11b^+$ DZ.

Da die iNOS-Produktion direkt von der IFN-γ Produktion durch Th_1-Gedächtnis-Zellen abhängt [Engel et al. 2010], könnte eine entscheidende Funktion von $CD103^+CD11b^+$ DZ die Aktivierung von Th1-Gedächtnis-Zellen zur Produktion von IFN-γ sein. Dies könnte dann der Ausgangspunkt der darauf folgenden Produktion von iNOS durch MPs sein und somit zur Entstehung eines POI führen.

Diese Ergebnisse demonstrieren eine neuartige, entscheidende Rolle von $CD103^+CD11b^+$ DZ bei der Entstehung einer Entzündungsreaktion eines wichtigen Krankheitsbildes.

Wir konnten im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass die *Muscularis externa* unter homöostatischen Bedingungen von residenten $Ly6C^-CX_3CR1^{high}$ MPs besiedelt ist und es nach intestinaler Manipulation zu einer Einwanderung von $Ly6C^+CX_3CR1^{low}$ inflammatorischen MPs kommt. Diese inflammatorischen MPs stammen von inflammatorischen Monozyten im Blut ab (Abb. 13). Eine Reduktion dieser Monozyten im Blut von *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen [Serbina and Pamer 2006; Engel et al. 2008], wie auch das Fehlen von MPs, abgeleitet von diesen Monozyten, in inflammierten, peripheren Geweben [Epelman et al. 2014; Engel et al. 2008; Kurihara et al. 1997] konnte von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden.

Entsprechend konnten wir auch in *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen bei einem POI eine Reduktion dieser MPs in der *Muscularis externa* des Dünn- und Dickdarms zeigen. Zusätzlich führte die Induktion des POI zu einer pathologischen iNOS-Produktion dieser MPs in der *Muscularis externa*, während Monozyten im Blut kein iNOS produzierten. Dies weist auf eine Umgehung von Toleranzmechanismen im POI durch den inflammatorischen Prozess des POI und die darin beteiligten inflammatorischen Mediatoren hin. Da die iNOS-Produktion dieser MPs von $CD103^+CD11b^+$ DZ abhängig ist, liegt eine Beteiligung dieser DZ an der Umgehung der Toleranz nahe. Weitere Studien sollten die Rolle von IL-12 und IFN-γ, produziert durch $CD103^+CD11b^+$ DZ, näher untersuchen. Hierzu würde

ein Promoter spezifisch für $CD103^+CD11b^+$ DZ benötigt, um diese Zytokine nur in $CD103^+CD11b^+$ DZ zu entfernen.

Inflammatorische $Ly6C^+CX_3CR1^{low}$ MPs sind an diversen inflammatorischen, pathologischen Krankheiten beteiligt, und deren Depletion wurde in unterschiedlichen Krankheitsbildern untersucht [Zigmond et al. 2012; Schiwon et al. 2014; Serbina and Pamer 2006; Epelman et al. 2014; Kurihara et al. 1997]. Auch wir untersuchten, ob eine genetische Depletion mittels *Ccr2*$^{-/-}$ oder eine chemische Depletion mittels Clodronat Liposomen einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf des POI hat. Sowohl die genetische als auch die chemische Depletion hatten jedoch im Dünndarm keinen Einfluss auf den beim POI vorhandenen Verlust der Dünndarmmotorik. Diese Untersuchung schließt eine Rolle dieser MPs in der Wundheilung nach erfolgtem Ileus jedoch nicht aus, da im Rahmen dieser Arbeit nur frühe Untersuchungszeitpunkte gewählt wurden und die Heilungsphase des Ileus nicht betrachtet wurde. Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten nach der intestinalen Manipulation haben gezeigt, dass die Heilung des Ileus in *Ccr2*$^{-/-}$ Mäusen verzögert ist [Farro et al. 2017]. Wir fanden jedoch eine Verbesserung der Dickdarmmotorik, sowohl nach genetischer als auch chemischer Depletion von diesen MPs. Dies deutet auf unterschiedliche Toleranzmechanismen des POI in Dünn- und Dickdarm hin.

Da die alleinige Depletion von $Ly6C^+CX_3CR1^{low}$ MPs zu keiner Verbesserung der Dünndarmmotorik führte, deutete dies auf alternative, am POI beteiligte iNOS produzierende Zellen hin.

Tatsächlich fanden wir residente $Ly6C^-CX_3CR1^{high}$ MPs, die nach Manipulationsstimulus im Dünndarm ebenfalls iNOS produzierten. Dies erklärt, warum die alleinige Depletion von $Ly6C^+CX_3CR1^{low}$ MPs im Dünndarm zu keiner Veränderung der Dünndarmmotorik führte.

Um die funktionelle Beteiligung residenter $Ly6C^-CX_3CR1^{high}$ MPs am POI zu untersuchen, wurde ein System zur Depletion dieser MPs benötigt. Wir entschieden uns hierbei für eine konditionale Depletion in *Cx3cr1-Cre* x *iDTR*^{flox} knochenmarkschimären Mäusen, um einen Effekt zentralnervöser Depletion von CX_3CR1^+ Zellen [Bruttger et al. 2015] zu vermeiden. Hier konnten die lange und stark CX_3CR1 exprimierenden, residenten MPs depletiert werden und zwar ohne die Anzahl $Ly6C^+CX_3CR1^{low}$ inflammatorischer MPs in der manipulierten *Muscularis* wesentlich zu verändern (Abb. 16C). Diese exprimieren

zwar auch CX_3CR1, allerdings gegenüber residenten MPs geringer und für eine kürzere Zeit, so dass es vermutlich nur in wenigen dieser Zellen zu einer Rekombination im iDTR-Lokus kommt. Entsprechend war im Blut von depletierten Mäusen nur eine geringe Reduktion der inflammatorischen Monozyten im Blut zu erkennen. Diese geringe Veränderung der Blutmonozytenanzahl könnte des Weiteren durch einen verstärkten Influx dieser Monozyten in die nach Manipulation inflammierte *Muscularis* ausgeglichen werden. Dies könnte erklären, warum inflammatorische $Ly6C^+CX_3CR1^{low}$ MPs in der *Muscularis* von manipulierten und depletierten Mäusen nicht reduziert waren. Beachtenswert war, dass es zusätzlich zu einer Reduktion von $CD103^+CD11b^+$ DZ kam, die jedoch deutlich geringer als die Reduktion dieser DZ in *Cd11c-Cre* x *Irf4*^{flox} ausfiel.

Dass die alleinige Depletion mittels DT in *Cx3cr1-Cre x iDTR*^{flox} Knochenmarkschimären zu keiner Verbesserung der Dünndarmmotorik führt, zeigt einerseits, dass das Fehlen von residenten MPs kompensiert wird und andererseits, dass eine geringe Reduktion von $CD103^+CD11b^+$ DZ alleine nicht ausreichend ist, um eine Induktion des POI zu verhindern. Dies wiederum weißt auf die Effizienz dieser Zellpopulation hin, da nur wenige $CD103^+CD11b^+$ DZ hinreichend zur Induktion eines POI sind.

Wir vermuteten nun, basierend auf dem Ergebnis, dass inflammatorische $Ly6C^+CX_3CR1^{low}$ und residente $Ly6C^-CX_3CR1^{high}$ MPs nach Manipulation iNOS produzieren, dass der Verlust von residenten bzw. inflammatorischen MPs jeweils durch den anderen Makrophagentyp kompensiert wird. Daher kombinierten wir die DT-induzierte Depletion in *Cx3cr1-Cre* x *iDTR*^{flox} Knochenmarkschimären mit der chemischen Depletion mittels Clodronat-Liposomen, um, zusätzlich zu residenten, inflammatorische MPs zu depletieren. Die aus dieser kombinierten Depletion entstehende Verbesserung der Dünndarmmotilität zeigte, dass im Dünndarm residente und inflammatorische MPs für die Entstehung des POI verantwortlich sind und gleichzeitig die Anwesenheit eines der beiden Makrophagentypen hinreichende Bedingung zur Entstehung eines POI ist.

Nennenswert ist eine neue Publikation, die ein Zusammenspiel zwischen lokalem Mikrobiom und residenten MPs beschreibt, das zu einer positiven Regulation der Darmmotilität führt [Muller et al. 2014]. Die Abwesenheit von residenten MPs wirkt sich dann unter nicht inflammatorischen Bedingungen negativ auf die Peristaltik aus. Hier

besteht ein Unterschied zwischen der homöostatischen und der inflammatorischen Rolle residenter Makrophagen. Dies zeigt auf, dass nach IM die pathologische iNOS-Produktion dieser MPs deren positiven Effekt auf die Darmmotilität überwiegen kann.

Im Gegensatz zum Dünndarm war im Dickdarm die alleinige Depletion von $Ly6C^{+}CX_3CR1^{low}$ MPs ausreichend zur Verbesserung der Dickdarmmotilität. Im Gegensatz zur iNOS-Produktion von residenten $Ly6C^{-}CX_3CR1^{high}$ MPs im Dünndarm, produzierten residente MPs im Dickdarm nach intestinaler Manipulation kein iNOS. Die Anwesenheit von inflammatorischen $Ly6C^{+}CX_3CR1^{low}$ MPs war zur Entstehung eines POI notwendige Bedingung.

Wir konnten durch unsere Versuche ausschließen, dass dies auf unterschiedliche Manipulationsorte und die damit verbundene Schädigung des Gewebes und Freisetzung von DAMPs (*Danger associated molecular patterns*) zurückzuführen ist. Dies deutet daraufhin, dass diese Toleranz von residenten MPs im Dickdarm somit eine intrinsische Eigenschaft des Dickdarms ist. Dieses Ergebnis wird durch weitere Studien unterstützt, die aufzeigen, dass der tolerante, nicht inflammatorische Status von residenten MPs der *Mucosa* des Dickdarms auch nach einem inflammatorischen Stimulus erhalten bleibt [Zigmond et al. 2012; Rivollier et al. 2012]. Eine Erklärung könnte die unterschiedliche Verteilung von $CD103^{+}CD11b^{+}$ DZ im Darm sein. Während diese DZ im Dünndarm vorhanden und an der Entstehung des POI beteiligt sind, konnten wir nachweisen, dass $CD103^{+}CD11b^{+}$ DZ im Dickdarm nicht vorhanden sind. Dies wird auch durch andere Studien bestätigt [Denning et al. 2011]. Die dadurch im Dickdarm potenziell fehlende Aktivierung von residenten MPs zur iNOS-Produktion nach SIM oder LIM könnte somit die unterschiedliche iNOS-Expression zwischen Dünn- und Dickdarm erklären. Zusätzlich wurde für andere periphere Gewebe ein Einfluss des lokalen Mikromilieus auf die Modulation der Immunantwort nachgewiesen [Zigmond and Jung 2013; Le Noci et al. 2018; Gollwitzer et al. 2014].

Eine Erklärung für den toleranten Status residenter MPs im Dickdarm könnten außerdem die Unterschiede im Mikrobiom zwischen Dünn- und Dickdarm sein. Die Mikrobiota des Dickdarms ist deutlich zahlreicher und anders zusammengesetzt als die des Dünndarms [Caballero and Pamer 2015; Berg 1996; DUBOS et al. 1965]. Der dauerhafte Kontakt zwischen Mikrobiom und residenten MPs könnte die

iNOS-Produktion durch diese MPs inhibieren, um Schäden am lokalen Gewebe und eine andauernde Inflammation zu verhindern. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse gestützt, die aufzeigen, dass das Darmimmunsystem durch seinen ständigen Kontakt zum Mikrobiom toleranter reagiert [Zigmond and Jung 2013; Verma et al. 2018; Atarashi et al. 2011; Geuking et al. 2011].

Wir entschieden uns, den Einfluss des Mikrobioms auf den POI näher zu untersuchen. Ein Versuch, den Einfluss des Mikrobioms auf die Toleranz residenter MPs spezifisch im Dickdarm experimentell zu untersuchen, stellte sich jedoch schwierig dar, weil mit Antibiotika behandelte Mäuse keinen POI des Dickdarms entwickelten. Wir untersuchten daher näher die Rolle des Mikrobioms auf den POI.

Wie beschrieben, führte das Fehlen von $CD103^+CD11b^+$ DZ zu einer Reduktion der iNOS-Produktion in MPs. Th1-Gedächtnis-Zellen wiederum werden von DZ aktiviert und induzieren selbst, über ihre IFN-γ Produktion, MPs zur iNOS Expression [Engel et al. 2010]. Welcher Stimulus $CD103^+CD11b^+$ DZ aktiviert und die POI-Kaskade auslöst, ist ungeklärt. Wir untersuchten daher die mit Antibiotika behandelten Mäuse und fanden eine deutliche Reduktion der iNOS mRNA. Auch die Expression und die Proteinkonzentration von IFN-γ waren deutlich reduziert. Dies deutet darauf hin, dass es unter Abwesenheit des Mikrobioms zu keiner Aktivierung von DZ und damit auch Th1-Gedächtnis-Zellen kommt. Eine direkte Einwirkung des Mikrobioms auf $CD103^+CD11b^+$ DZ konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht nachgewiesen werden. Jedoch ist eine Translokation des Mikrobioms in die mLN und eine erhöhte Permeabilität des Darmepithels nach intestinaler Manipulation gezeigt worden [Snoek et al. 2012; Schwarz et al. 2002]. Auch wurde bereits demonstriert, dass die MyD88-abhängige Detektion von mikrobiellen Agenzien zur IL-12 Produktion von DZ führt [Krummen et al. 2010; Zhan et al. 2010]. Im Modell des POI wurde nachgewiesen, dass MyD88 abhängige Signale für einen POI benötigt werden [Stoffels et al. 2014].

In der Tat konnte außerhalb des Rahmens dieser Arbeit gezeigt werden, dass es in Antibiotika behandelten, manipulierten Mäusen zu einer Reduktion von IL-12 in der *Muscularis* kommt [Pohl et al. 2017]. Dies deutet auf einen direkten Effekt des Mikrobioms auf die IL-12 produzierenden $CD103^+CD11b^+$ DZ hin, beweist ihn allerdings nicht. Hierfür wären Mäuse notwendig, in denen die mikrobielle Detektion nur in $CD103^+CD11b^+$ DZ inhibiert ist, z.B. durch eine konditionale Depletion von MyD88 in

$CD103^+CD11b^+$ DZ. Dies würde das Vorhandensein eines Promoters spezifisch für $CD103^+CD11b^+$ DZ bedingen.

Das Ergebnis, dass MyD88 und TLR Signale für den POI benötigt werden, wird durch den Befund der Notwendigkeit eines Mikrobioms für den POI bestätigt und erweitert: Das Mikrobiom erscheint zwingend notwendig zur POI-Induktion. Außerdem konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass dieses Ergebnis kein Seiteneffekt der Antibiotikabehandlung ist und damit tatsächlich auf den Verlust des Mikrobioms zurückgeführt werden kann. Die Reduktion des POI konnte durch Rekonstitution mit Fäkalien in Antibiotika behandelten Mäusen aufgehoben werden. Des Weiteren erstreckt sich diese Reduktion auch auf den Dünndarm, denn außerhalb des Rahmens dieser Arbeit wurde das Ergebnis erbracht, dass auch die Dünndarmmotilität in Antibiotika behandelten, manipulierten Mäusen wiederhergestellt ist [Pohl et al. 2017].

Insgesamt eröffnen die Ergebnisse dieser Arbeit potenzielle neue Therapiemechanismen zur Behandlung eines POI. Die Inhibition von IL-12 sowie iNOS könnte sich positiv auf die Darmmotilität nach intestinalen Operationen auswirken. Die Modulation des Mikrobioms könnte eine Entstehung des POI verhindern, da es dann nicht zu einer Aktivierung von DZ kommt. Hierzu müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, welche Bestandteile des Mikrobioms DZ zur IL-12 Produktion anregen. Dies könnte eine noch spezifischere Prävention des POI erlauben.

Insgesamt zeigt diese Studie eine neue Rolle von $CD103^+CD11b^+$ DZ im Immunsystem des Darms und eine differentielle Abhängigkeit des POI von residenten $Ly6C^-CX_3CR1^{high}$ und inflammatorischen $Ly6C^+CX_3CR1^{low}$ MPs im Dünn- und Dickdarm. Außerdem zeigt sie auf, dass auch in der *Muscularis* des Darms ein unterschiedliches Milieu zwischen Dünn- und Dickdarm die Immunantworten moduliert, und dies Auswirkungen auf die Mechanismen des POI hat. Sie demonstriert die Wichtigkeit des Mikrobioms im POI und zeigt damit therapeutische Optionen zur Behandlung und Prophylaxe eines POI auf. Weitere Studien sollten eine Therapie des POI durch die Modulation des Mikrobioms untersuchen.

9 Quellen

F. Aktan. 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* 75, 6 (June 2004), 639–653. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.042

K. Atarashi et al. 2011. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* 331, 6015 (January 2011), 337–341. DOI:http://dx.doi.org/10.1126/science.1198469

C. Auffray et al. 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, 5838 (August 2007), 666–670. DOI:http://dx.doi.org/10.1126/science.1142883

C. Auffray, M.H. Sieweke, and F. Geissmann. 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27 (January 2009), 669–692. DOI:http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557

C.C. Bain et al. 2013. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol* 6, 3 (May 2013), 498–510. DOI:http://dx.doi.org/10.1038/mi.2012.89

A.J. Bauer, N.T. Schwarz, B.A. Moore, A. Türler, and J.C. Kalff. 2002. Ileus in critical illness: mechanisms and management. *Curr Opin Crit Care* 8, 2 (April 2002), 152–157.

M. Becker et al. 2014. Ontogenic, Phenotypic, and Functional Characterization of XCR1(+) Dendritic Cells Leads to a Consistent Classification of Intestinal Dendritic Cells Based on the Expression of XCR1 and SIRPα. *Front Immunol* 5 (2014), 326. DOI:http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00326

R.D. Berg. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4, 11 (November 1996), 430–435.

M. Bogunovic et al. 2009. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31, 3 (September 2009), 513–525. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.010

J. Bruttger et al. 2015. Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity* 43, 1 (July 2015), 92–106. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.012

S. Caballero and E.G. Pamer. 2015. Microbiota-mediated inflammation and antimicrobial defense in the intestine. *Annu Rev Immunol* 33, 1 (2015), 227–256. DOI:http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120238

V. Cerovic et al. 2013. Intestinal CD103(-) dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells. *Mucosal Immunol* 6, 1 (January 2013), 104–113. DOI:http://dx.doi.org/10.1038/mi.2012.53

V. Cerovic et al. 2015. Lymph-borne CD8α+ dendritic cells are uniquely able to cross-prime CD8+ T cells with antigen acquired from intestinal epithelial cells. *Mucosal Immunol* 8, 1 (January 2015), 38–48. DOI:http://dx.doi.org/10.1038/mi.2014.40

V. Cerovic, C.C. Bain, A.M. Mowat, and S.W.F. Milling. 2014. Intestinal macrophages and dendritic cells: what's the difference? *Trends Immunol.* 35, 6 (June 2014), 270–277. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2014.04.003

M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, and D.C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 5148 (February 1994), 802–805.

K. Crozat et al. 2010. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 207, 6 (June 2010), 1283–1292.

DOI:http://dx.doi.org/10.1084/jem.20100223
T.L. Denning et al. 2011. Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization. *J Immunol* 187, 2 (July 2011), 733–747. DOI:http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1002701
T.L. Denning, Y.-C. Wang, S.R. Patel, I.R. Williams, and B. Pulendran. 2007. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* 8, 10 (October 2007), 1086–1094. DOI:http://dx.doi.org/10.1038/ni1511
J. Diamond. 1978. Role of cyclic nucleotides in control of smooth muscle contraction. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 9 (1978), 327–340.
R. DUBOS, R.W. SCHAEDLER, R. COSTELLO, and P. HOET. 1965. INDIGENOUS, NORMAL, AND AUTOCHTHONOUS FLORA OF THE GASTROINTESTINAL TRACT. *J Exp Med* 122, 1 (July 1965), 67–76. DOI:http://dx.doi.org/10.1084/jem.122.1.67
B.T. Edelson et al. 2010. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 + conventional dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 207, 4 (April 2010), 823–836. DOI:http://dx.doi.org/10.1084/jem.20091627
D.R. Engel et al. 2008. CCR2 mediates homeostatic and inflammatory release of Gr1(high) monocytes from the bone marrow, but is dispensable for bladder infiltration in bacterial urinary tract infection. *J Immunol* 181, 8 (October 2008), 5579–5586.
D.R. Engel et al. 2010. T helper type 1 memory cells disseminate postoperative ileus over the entire intestinal tract. *Nat. Med.* 16, 12 (December 2010), 1407–1413. DOI:http://dx.doi.org/10.1038/nm.2255
S. Epelman, K.J. Lavine, and G.J. Randolph. 2014. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 41, 1 (July 2014), 21–35. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013
B.D.G. Evers et al. 2016. CD103+ Kidney Dendritic Cells Protect against Crescentic GN by Maintaining IL-10-Producing Regulatory T Cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* (April 2016). DOI:http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2015080873
G. Farro et al. 2017. CCR2-dependent monocyte-derived macrophages resolve inflammation and restore gut motility in postoperative ileus. *Gut* 66, 12 (December 2017), 2098–2109. DOI:http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313144
G. Fejer, S. Sharma, and I. Gyory. 2015. Self-renewing macrophages--a new line of enquiries in mononuclear phagocytes. *Immunobiology* 220, 2 (February 2015), 169–174. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2014.11.005
D.K. Fogg et al. 2006. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311, 5757 (January 2006), 83–87. DOI:http://dx.doi.org/10.1126/science.1117729
R.F. Furchgott, P.D. Cherry, J.V. Zawadzki, and D. Jothianandan. 1984. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6 Suppl 2 (1984), S336–43. DOI:http://dx.doi.org/10.1097/00005344-198406002-00008
F. Geissmann, S. Jung, and D.R. Littman. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 1 (July 2003), 71–82.
F. Geissmann, M.G. Manz, S. Jung, M.H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 5966 (February 2010), 656–661. DOI:http://dx.doi.org/10.1126/science.1178331
M.B. Geuking et al. 2011. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory

T cell responses. *Immunity* 34, 5 (May 2011), 794–806. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.021

F. Ginhoux et al. 2009. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *Journal of Experimental Medicine* 206, 13 (December 2009), 3115–3130. DOI:http://dx.doi.org/10.1084/jem.20091756

E.S. Gollwitzer et al. 2014. Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nat. Med.* 20, 6 (June 2014), 642–647. DOI:http://dx.doi.org/10.1038/nm.3568

E. Gomez Perdiguero et al. 2015. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 7540 (February 2015), 547–551. DOI:http://dx.doi.org/10.1038/nature13989

S.J. Green et al. 1994. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol. Lett.* 43, 1-2 (December 1994), 87–94.

S.J. Green, R.M. Crawford, J.T. Hockmeyer, M.S. Meltzer, and C.A. Nacy. 1990. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 145, 12 (December 1990), 4290–4297.

M. Gross, T.-M. Salame, and S. Jung. 2015. Guardians of the Gut - Murine Intestinal Macrophages and Dendritic Cells. *Front Immunol* 6, 2 (2015), 254. DOI:http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00254

S. Hapfelmeier et al. 2008. Microbe sampling by mucosal dendritic cells is a discrete, MyD88-independent step in DeltainvG S. Typhimurium colitis. *Journal of Experimental Medicine* 205, 2 (February 2008), 437–450. DOI:http://dx.doi.org/10.1084/jem.20070633

L.J. Ignarro. 2000. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*,

Indolences. 2006. Wikimedia Gut. (December 2006).

R. Iyengar, D.J. Stuehr, and M.A. Marletta. 1987. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 18 (September 1987), 6369–6373. DOI:http://dx.doi.org/10.1073/pnas.84.18.6369

S. Iyer, W.B. Saunders, and S. Stemkowski. 2009. Economic burden of postoperative ileus associated with colectomy in the United States. *J Manag Care Pharm* 15, 6 (July 2009), 485–494. DOI:http://dx.doi.org/10.18553/jmcp.2009.15.6.485

M.H. Jang et al. 2006. CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J Immunol* 176, 2 (January 2006), 803–810.

S. Jung et al. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol. Cell. Biol.* 20, 11 (June 2000), 4106–4114.

J.C. Kalff, T.M. Carlos, W.H. Schraut, T.R. Billiar, R.L. Simmons, and A.J. Bauer. 1999. Surgically induced leukocytic infiltrates within the rat intestinal muscularis mediate postoperative ileus. *Gastroenterology* 117, 2 (August 1999), 378–387.

J.C. Kalff, W.H. Schraut, T.R. Billiar, R.L. Simmons, and A.J. Bauer. 2000. Role of inducible nitric oxide synthase in postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. *Gastroenterology* 118, 2 (February 2000), 316–327.

J.C. Kalff, S. Wehner, and B. Litkouhi. 2015. Postoperative ileus - UpToDate. (January 2015). Retrieved November 13, 2016 from https://www.uptodate.com/contents/postoperative-ileus?source=search_result&search=post%20operative%20ileus&selectedTitle=1~53

R. Kamijo et al. 1995. Generation of nitric oxide and clearance of interferon-gamma after BCG infection are impaired in mice that lack the interferon-gamma receptor. *J. Inflamm.* 46, 1 (1995), 23–31.
C.A. Klebanoff et al. 2013. Retinoic acid controls the homeostasis of pre-cDC-derived splenic and intestinal dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 210, 10 (September 2013), 1961–1976. DOI:http://dx.doi.org/10.1084/jem.20122508
F.W. Klotz et al. 1995. Co-localization of inducible-nitric oxide synthase and Plasmodium berghei in hepatocytes from rats immunized with irradiated sporozoites. *J Immunol* 154, 7 (April 1995), 3391–3395.
H.-J. Ko and S.-Y. Chang. 2015. Regulation of intestinal immune system by dendritic cells. *Immune Netw* 15, 1 (February 2015), 1–8. DOI:http://dx.doi.org/10.4110/in.2015.15.1.1
M. Krummen et al. 2010. Release of IL-12 by dendritic cells activated by TLR ligation is dependent on MyD88 signaling, whereas TRIF signaling is indispensable for TLR synergy. *J Leukoc Biol* 88, 1 (July 2010), 189–199. DOI:http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0408228
T. Kurihara, G. Warr, J. Loy, and R. Bravo. 1997. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med* 186, 10 (November 1997), 1757–1762. DOI:http://dx.doi.org/10.1084/jem.186.10.1757
W.A. Kuziel et al. 1997. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 22 (October 1997), 12053–12058.
V. Le Noci et al. 2018. Modulation of Pulmonary Microbiota by Antibiotic or Probiotic Aerosol Therapy: A Strategy to Promote Immunosurveillance against Lung Metastases. *Cell Rep* 24, 13 (September 2018), 3528–3538. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.090
S.H. Lee, P.M. Starkey, and S. Gordon. 1985. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. *J Exp Med* 161, 3 (March 1985), 475–489.
K.L. Lewis et al. 2011. Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine. *Immunity* 35, 5 (November 2011), 780–791. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.08.013
C.-Q. Li et al. 2006. Threshold Effects of Nitric Oxide-Induced Toxicity and Cellular Responses in Wild-Type and p53-Null Human Lymphoblastoid Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 3 (March 2006), 399–406. DOI:http://dx.doi.org/10.1021/tx050283e
H. Lippert. 2000. *Lehrbuch Anatomie* 2000 ed., Elsevier.
C.J. Lowenstein et al. 1993. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 20 (October 1993), 9730–9734. DOI:http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.20.9730
R. Lüllmann-Rauch. 2012. *Taschenlehrbuch Histologie* 4 ed., Thieme.
S. Mellouk, S.J. Green, C.A. Nacy, and S.L. Hoffman. 1991. IFN-gamma inhibits development of Plasmodium berghei exoerythrocytic stages in hepatocytes by an L-arginine-dependent effector mechanism. *J Immunol* 146, 11 (June 1991), 3971–3976.
H.B. Mikkelsen and L. Thuneberg. 1999. Op/op mice defective in production of functional colony-stimulating factor-1 lack macrophages in muscularis externa of the small intestine. *Cell Tissue Res.* 295, 3 (March 1999), 485–493.
S. Moncada and E.A. Higgs. 2006. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1, S1 (January 2006), S193–201.

DOI:http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0706458
P.A. Muller et al. 2014. Crosstalk between Muscularis Macrophages and Enteric Neurons Regulates Gastrointestinal Motility. *Cell* 158, 2 (July 2014), 300–313. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.050
M. Murai et al. 2009. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* 10, 11 (November 2009), 1178–1184. DOI:http://dx.doi.org/10.1038/ni.1791
T. Nguyen, D. Brunson, C.L. Crespi, B.W. Penman, J.S. Wishnok, and S.R. Tannenbaum. 1992. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 7 (April 1992), 3030–3034. DOI:http://dx.doi.org/10.1073/pnas.89.7.3030
J.-H. Niess et al. 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 5707 (January 2005), 254–258. DOI:http://dx.doi.org/10.1126/science.1102901
R.M. Palmer, A.G. Ferrige, and S. Moncada. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 6122 (June 1987), 524–526. DOI:http://dx.doi.org/10.1038/327524a0
E.K. Persson et al. 2013. IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. *Immunity* 38, 5 (May 2013), 958–969. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.03.009
A.M. Platt, C.C. Bain, Y. Bordon, D.P. Sester, and A.M. Mowat. 2010. An independent subset of TLR expressing CCR2-dependent macrophages promotes colonic inflammation. *J Immunol* 184, 12 (June 2010), 6843–6854. DOI:http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0903987
J.-M. Pohl et al. 2017. Irf4-dependent CD103+CD11b+ dendritic cells and the intestinal microbiome regulate monocyte and macrophage activation and intestinal peristalsis in postoperative ileus. *Gut* 66, 12 (December 2017), 2110–2120. DOI:http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2017-313856
S.L. Pull, J.M. Doherty, J.C. Mills, J.I. Gordon, and T.S. Stappenbeck. 2005. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 1 (January 2005), 99–104. DOI:http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0405979102
S. Rakoff-Nahoum, J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, and R. Medzhitov. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 2 (July 2004), 229–241. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002
G.J. Randolph, K. Inaba, D.F. Robbiani, R.M. Steinman, and W.A. Muller. 1999. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11, 6 (December 1999), 753–761.
M. Rescigno et al. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2, 4 (April 2001), 361–367. DOI:http://dx.doi.org/10.1038/86373
A. Rivollier, J. He, A. Kole, V. Valatas, and B.L. Kelsall. 2012. Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *Journal of Experimental Medicine* 209, 1 (January 2012), 139–155. DOI:http://dx.doi.org/10.1084/jem.20101387
R.T. Sasmono et al. 2003. A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood* 101, 3 (February 2003), 1155–1163.

DOI:http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-02-0569
A.T. Satpathy et al. 2013. Notch2-dependent classical dendritic cells orchestrate intestinal immunity to attaching-and-effacing bacterial pathogens. *Nat Immunol* 14, 9 (September 2013), 937–948. DOI:http://dx.doi.org/10.1038/ni.2679
M. Schiwon et al. 2014. Crosstalk between sentinel and helper macrophages permits neutrophil migration into infected uroepithelium. *Cell* 156, 3 (January 2014), 456–468. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.006
C. Schulz et al. 2012. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336, 6077 (April 2012), 86–90. DOI:http://dx.doi.org/10.1126/science.1219179
O. Schulz and O. Pabst. 2013. Antigen sampling in the small intestine. *Trends Immunol.* 34, 4 (April 2013), 155–161. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.09.006
O. Schulz et al. 2009. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *Journal of Experimental Medicine* 206, 13 (December 2009), 3101–3114. DOI:http://dx.doi.org/10.1084/jem.20091925
N.T. Schwarz et al. 2004. Selective jejunal manipulation causes postoperative pan-enteric inflammation and dysmotility. *Gastroenterology* 126, 1 (January 2004), 159–169. DOI:http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2003.10.060
N.T. Schwarz, D. Beer-Stolz, R.L. Simmons, and A.J. Bauer. 2002. Pathogenesis of paralytic ileus: intestinal manipulation opens a transient pathway between the intestinal lumen and the leukocytic infiltrate of the jejunal muscularis. *Annals of Surgery* 235, 1 (January 2002), 31–40.
C.L. Scott et al. 2015. CCR2(+)CD103(-) intestinal dendritic cells develop from DC-committed precursors and induce interleukin-17 production by T cells. *Mucosal Immunol* 8, 2 (March 2015), 327–339. DOI:http://dx.doi.org/10.1038/mi.2014.70
M.C. Seguin. 1994. Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated Plasmodium berghei infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8+ T cells. *J Exp Med* 180, 1 (July 1994), 353–358. DOI:http://dx.doi.org/10.1084/jem.180.1.353
H. Seno, H. Miyoshi, S.L. Brown, M.J. Geske, M. Colonna, and T.S. Stappenbeck. 2009. Efficient colonic mucosal wound repair requires Trem2 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 1 (January 2009), 256–261. DOI:http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0803343106
N.V. Serbina and E.G. Pamer. 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7, 3 (March 2006), 311–317. DOI:http://dx.doi.org/10.1038/ni1309
N.V. Serbina, T. Jia, T.M. Hohl, and E.G. Pamer. 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26, 1 (2008), 421–452. DOI:http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326
C. Shi and E.G. Pamer. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11, 11 (November 2011), 762–774. DOI:http://dx.doi.org/10.1038/nri3070
S.A. Snoek et al. 2012. Mast cells trigger epithelial barrier dysfunction, bacterial translocation and postoperative ileus in a mouse model. *Neurogastroenterol. Motil.* 24, 2 (February 2012), 172–84– e91. DOI:http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01820.x
B. Stoffels et al. 2014. Postoperative ileus involves interleukin-1 receptor signaling in enteric glia. *Gastroenterology* 146, 1 (January 2014), 176–87.e1. DOI:http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.09.030

D.J. Stuehr and M.A. Marletta. 1985. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 22 (November 1985), 7738–7742. DOI:http://dx.doi.org/10.1073/pnas.82.22.7738

S. Tamoutounour et al. 2012. CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *Eur. J. Immunol.* 42, 12 (December 2012), 3150–3166. DOI:http://dx.doi.org/10.1002/eji.201242847

A. Türler et al. 2006. Leukocyte-derived inducible nitric oxide synthase mediates murine postoperative ileus. *Annals of Surgery* 244, 2 (August 2006), 220–229. DOI:http://dx.doi.org/10.1097/01.sla.0000229963.37544.59

A. Türler, N.T. Schwarz, E. Türler, J.C. Kalff, and A.J. Bauer. 2002. MCP-1 causes leukocyte recruitment and subsequently endotoxemic ileus in rat. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282, 1 (January 2002), G145–55. DOI:http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00263.2001

S. Uematsu et al. 2008. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* 9, 7 (May 2008), 769–776. DOI:http://dx.doi.org/10.1038/ni.1622

C. Varol, A. Vallon-Eberhard, et al. 2009. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* 31, 3 (September 2009), 502–512. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.025

C. Varol, S. Yona, and S. Jung. 2009. Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes. *Immunol Cell Biol* 87, 1 (January 2009), 30–38. DOI:http://dx.doi.org/10.1038/icb.2008.90

C. Varol, E. Zigmond, and S. Jung. 2010. Securing the immune tightrope: mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria. *Nat Rev Immunol* 10, 6 (June 2010), 415–426. DOI:http://dx.doi.org/10.1038/nri2778

R. Verma et al. 2018. Cell surface polysaccharides of Bifidobacterium bifidum induce the generation of Foxp3+ regulatory T cells. *Sci Immunol* 3, 28 (October 2018), eaat6975. DOI:http://dx.doi.org/10.1126/sciimmunol.aat6975

B. Weber, L. Saurer, M. Schenk, N. Dickgreber, and C. Mueller. 2011. CX3CR1 defines functionally distinct intestinal mononuclear phagocyte subsets which maintain their respective functions during homeostatic and inflammatory conditions. *Eur. J. Immunol.* 41, 3 (March 2011), 773–779. DOI:http://dx.doi.org/10.1002/eji.201040965

S. Wehner et al. 2007. Inhibition of macrophage function prevents intestinal inflammation and postoperative ileus in rodents. *Gut* 56, 2 (February 2007), 176–185. DOI:http://dx.doi.org/10.1136/gut.2005.089615

S. Wehner et al. 2009. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase pathway as prophylaxis of postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* 136, 2 (February 2009), 619–629. DOI:http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.017

D.A. Wink et al. 1991. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254, 5034 (November 1991), 1001–1003. DOI:http://dx.doi.org/10.1126/science.1948068

Q.W. Xie et al. 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256, 5054 (April 1992), 225–228. DOI:http://dx.doi.org/10.1126/science.1373522

Q.W. Xie, Y. Kashiwabara, and C. Nathan. 1994. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 269, 7 (February 1994), 4705–4708.

S. Yona et al. 2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 1 (January 2013), 79–91. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001

Y. Zhan et al. 2010. Resident and monocyte-derived dendritic cells become dominant IL-12 producers under different conditions and signaling pathways. *J Immunol* 185, 4 (August 2010), 2125–2133. DOI:http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0903793

E. Zigmond and S. Jung. 2013. Intestinal macrophages: well educated exceptions from the rule. *Trends Immunol.* 34, 4 (April 2013), 162–168. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2013.02.001

E. Zigmond et al. 2012. Ly6C hi monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity* 37, 6 (December 2012), 1076–1090. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.026

E. Zigmond et al. 2014. Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity* 40, 5 (May 2014), 720–733. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.03.012

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anatomie des Darms. 9

Abb. 2: Progression des POI 10

Abb. 3: Die Emigration von Ly6C$^+$ Monozyten aus dem Knochenmark 12

Abb. 4: Gewebsmakrophagen und Monozyten unterschiedlicher Gewebe stammen in ihrer Entwicklung aus unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten 14

Abb. 5: Residente und inflammatorische MPs exprimieren unterschiedliche Marker und erfüllen unterschiedliche Funktionen in der *Lamina propria* (LP) des Darms 16

Abb. 6: Markerexpression, Abstammung und Funktion unterschiedlicher DZ in der *Lamina propria* des Mäusedarms. 18

Abb. 7: Residente MPs regulieren abhängig vom Mikrobiom die Muskelkontraktion unter homöostatischen Bedingungen 20

Abb. 8: NO wird von MPs im Rahmen der bakteriellen Abwehr produziert und relaxiert die glatte Muskulatur in Myozyten. 22

Abb. 9: Mechanismen des Postoperativen Ileus 24

Abb. 10: CD103$^+$CD11b$^+$ DZ wandern nach intestinaler Manipulation des Dünndarms (SIM) ein und sind von IRF4 abhängig 51

Abb. 11: Der POI hängt von CD103$^+$CD11b$^+$ DZ ab 53

Abb. 12: Die iNOS-Produktion von MPs ist reduziert in *Cd11c-Cre*$^+$ Mäusen 55

Abb. 13: Die Anwesenheit von inflammatorischen, aus dem Blut einwandernden Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs nach SIM hängt von CCR2 ab, die von residenten Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs nicht 58

Abb. 14: Die Abwesenheit von CCR2 abhängigen Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} MPs beeinflusst den Ileus nach SIM nicht, auch Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs exprimieren iNOS nach Manipulation 60

Abb. 15: Clodronat Liposomen depletieren Ly6C$^+$CX$_3$CR1^{low} aber nicht Ly6C$^-$CX$_3$CR1^{high} MPs, dies beeinflusst den Ileus nach SIM nicht. 62

Abb. 16: Der POI des Dünndarm wird induziert von $Ly6C^{-}CX_3CR1^{high}$ MPs oder $Ly6C^{+}CX_3CR1^{low}$ MPs 65

Abb. 17: Die Anwesenheit von inflammatorischen $Ly6C^{+}CX_3CR1^{low}$ MPs nach SIM findet sich auch im Dickdarm und hängt von CCR2 ab. Auch residente, von CCR2 unabhängige, $Ly6C^{-}CX_3CR1^{high}$ MPs sind im Dickdarm vorhanden 67

Abb. 18: Der POI des Dickdarms hängt von $Ly6C^{+}CX_3CR1^{low}$ MPs ab 69

Abb. 19: $Ly6C^{-}CX_3CR1^{high}$ MPs produzieren im Dickdarm nach Dünn- oder Dickdarmmanipulation kein iNOS, $CD103^{+}CD11b^{+}$ DZ fehlen im Dickdarm. 71

Abb. 20: Die Aktivierung von MPs und der POI des Dickdarms hängen vom Mikrobiom ab 73

11 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Geräte und deren Hersteller 28

Tab. 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller 30

Tab. 3: Verwendete Reagenzien und deren Hersteller 33

Tab. 4: Verwendete Antikörper 34

Tab. 5: Verwendete Primer 34

Tab. 6: Verwendete Kits und deren Hersteller 35

Tab. 7: Verwendete Software und deren Hersteller bzw. Webseite 35

Tab. 8: PCR-Ansatz zur Genotypisierung im *Irf4*-Lokus 46

Tab. 9: PCR-Programm zur Genotypisierung im *Irf4*-Lokus 47

Tab. 10: PCR-Ansatz zur Genotypisierung im *Cd11c*-Lokus 47

Tab. 11: PCR-Programm zur Genotypisierung im *Cd11c*-Lokus 48

Tab. 12: Abkürzungsverzeichnis 95

Tab. 13: Bildquellennachweis für Fremdquellen inkl. Lizenz 97

Tab. 14: Tabellarischer Lebenslauf ..... **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

12 Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
BMP2	*Bone Morphogenetic Protein 2*
BMPR	*Bone Morphogenetic Protein* Rezeptor
CCR2	*C-C chemokine Receptor type 2*, ein Chemokinrezeptor
cDNA	*complementary DNA* / komplementäre DNS
cGMP	*Cyclic Guanosine Monophosphate*
CloLip	Clodronat Liposomen
Cre	Cre Rekombinase Enzym
CSF1	*Colony Stimulating Factor 1*
CSF1R	*Colony Stimulating Factor 1* Rezeptor
CX3CR1	*CX3C Chemokine Receptor 1*
DAMPs	*Danger Associated Molecular Patterns* / mit Gefahr assoziierte Molekülstrukturen
DSS	Dextransodiumsulfat
DT	Diphteriatoxin
DTR	Diphteriatoxin Rezeptor
DZ	Dendritische Zellen
EDRF	*Endothelium Derived Relaxing Factor*

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	*Enzyme-linked Immunosorbent Assay* / ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren
eNOS	*Endothelial Nitrogenoxide Synthase* / endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
FACS	*Fluorescence Activated Cell Sorting* / fluoreszenz basierte Zellsortiertung
FC	*Flow Cytometry* / Durchflusszytometrie
Fc-Rezeptor	Membranrezeptor für Immunglobuline
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flox	*Flanked by loxP* / flankiert von loxP Sequenzen
FLT-1 / VEGFR-1	*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1*
G cyclase	Guanylatzyklase
G Kinase	Guanylatkinase
gDNA	genomische DNA
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase, ein Enzym im Purinstoffwechsel
ICAM-1	*Intracellular Adhesion Molecule 1*
iDTR	induzierter Diphteriatoxin Rezeptor
IFN-γ	Interferon-gamma, ein Botenstoff

IM	Intestinale Manipulation
inflamm.	inflammatorisch
iNOS	*inducible Nitrogenoxide Synthase* / induzierte Stickstoffmonoxid Synthase
Irf4	*Interferon Regulatory Factor 4*
KO	Knock-Out, üblicherweise das Fehlen eines Gens
LFA-1	*Lymphocyte Function-Associated antigen 1*
LIM	Intestinale Manipulation des Dickdarms
LP	*Lamina propria*
MCP-1	*Monocyte Chemotactic Protein 1*
MIP-1α	*Macrophage Inflammatory Protein 1 α*
mLN	*mesenteric Lymph Node* / mesenterische Lymphknoten
MOs	Monozyten
MPs	Makrophagen
NK	Natürliche Killer (Zelle)
NKT	Natürliche Killer T-(Zelle)
NO	Stickstoffmonoxid
Nos2	Gen des Proteins iNOS
$Op^{-/-}$	Osteopetrose Mäuse (CSF-1 defizient)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung

PCR	*Polymerase Chain Reaction* / Polymerasekettenreaktion
POI	Postoperativer Ileus
qRT-PCR	*quantitative Real Time PCR* / quantitative Echtzeitpolymerasekettenreaktion
RCB	*Red Cell Buffer* / Lysepuffer für rote Blutzellen
RT-PCR	*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* / reverse Transkription Polymerasekettenreaktion
Sham	Scheinmanipulation, bzw. „Schein“
SIM	Intestinale Manipulation des Dünndarms
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
WT	Wildtyp

Tab. 12: Abkürzungsverzeichnis

13 Bildquellennachweis

Bild	Quelle	Lizenz	Autor
Bakterium (modifiziert) in Abb. 5, Abb. 6, Abb. 7, Abb. 8, Abb. 9	https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Prokaryote_cell.svg	Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International	Ali Zifan
Darmstruktur (modifiziert) in Abb. 1 und Abb. 2	https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Stomach_colon_rectum_diagram_unlabeled.svg	Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International	William Crochot
Knochen (modifiziert) in Abb. 3 und Abb. 4	https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bone_cross-section.svg	Creative Commons Attribution 3.0 Unported	Pbroks13
Totenkopf (modifiziert) in Abb. 8	http://publicdomainvectors.org/en/free-clipart/Skull-and-cross-bones-vector-line-art-image/21158.html	Public domain	
Monozyt (modifiziert) in Abb. 3	https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Monocyte.svg	Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International	A. Rad / Domdomegg

Erythrozyt und aufgeschnittene Vene in Abb. 3 (modifiziert)	https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Capillary.svg	Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported	Kelvin Ma Benutzername: Kelvin13

Tab. 13: Bildquellennachweis für Fremdquellen inkl. Lizenz. Link zur Lizenz „Commons Attribution 3.0 Unported“: https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode. Link zur Lizenz „Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International“: https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/legalcode. Link zur Lizenz Creative Commons „Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported“: https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/legalcode

14 Tabellarischer Lebenslauf Sebastian Gutweiler

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

15 Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema **„CD103$^+$CD11b$^+$ dendritische Zellen, das Mikrobiom sowie im Dünn- und Dickdarm unterschiedliche Makrophagenpopulationen sind essenziell für einen murinen Postoperativen Ileus“** zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von ***Sebastian Gutweiler*** befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____ _____

Unterschrift des Betreuers Prof. Dr. Daniel Engel, Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegeben Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____ _____

Unterschrift des Doktoranden Sebastian Gutweiler

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____ _____

Unterschrift des Doktoranden Sebastian Gutweiler